

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía

Papel de la PTHrP en la aterosclerosis
experimental y humana.
Modulación por la simvastatina.

Tesis Doctoral

César Aparicio Martínez
Madrid, 2012

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía

Papel de la PTHrP en la aterosclerosis
experimental y humana.
Modulación por la simvastatina.

Tesis Doctoral

César Aparicio Martínez
Madrid, 2012

Universidad autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía

Papel de la PTHrP en la aterosclerosis
experimental y humana.
Modulación por la simvastatina.

César Aparicio Martínez
Tesis Doctoral

Directores: José Luis Martín Ventura
Jesús Egido De Los Ríos

Tutor: Antonio Del Río Prego

Don José Luis Martín Ventura, Doctor en biología por la Universidad autónoma de Madrid y Don Jesús Egido De Los Ríos, Doctor en Medicina y Catedrático de Medicina en la Universidad autónoma de Madrid, como directores de tesis y Don Antonio Del Río Prego, Doctor en medicina por la Universidad autónoma de Madrid, como tutor.

CERTIFICAN

Que la presente tesis titulada **"Papel de la PTHrP en la aterosclerosis experimental y humana. Modulación por la simvastatina"** ha sido realizada por Don César Aparicio Martínez, Licenciado en Medicina, bajo nuestra dirección y se encuentra concluida.

Y para que conste firman el siguiente certificado

Dr. José Luis Martín Ventura

Dr. Jesús Egido De Los Ríos

Dr. Don Antonio Del Río Prego

A Esther
A mi familia

Agradecimientos

Son ya muchos los años en los comencé a meterme por el laboratorio del Dr Egido y descubrí el mundillo de la investigación, entonces me parecían héroes por dedicar horas y horas a este trabajo con absoluta dedicación e ilusión sin caer en el desánimo por las repeticiones del ensayo o por no obtener los resultados deseados una y otra vez. Sin embargo cada que he subido al laboratorio me ha parecido un remanso de tranquilidad donde todo el mundo tiene algo que hacer y está absorto en ello.

Quisiera agradecer en primer lugar a Miguel Ángel la fascinación que despertó en mí por la investigación y en general a todo el laboratorio de la cuarta y al de reuma por su colaboración.

Agradecer a José Luis toda la ayuda y supervisión que me ha prestado y la paciencia que ha tenido conmigo explicándome un montón de dudas que para él eran de lo más básico.

Al Dr. Egido por que siempre me ha presentado la tesis como algo fácil, que ya estaba hecho, que solo era echar dos ratos.

A todo el Servicio de Cirugía Vascular: en especial a Antonio, Alejandro, Ana...por su colaboración continua en la recogida de muestras y pacientes durante años y por sus ánimos.

A mi familia por su apoyo incondicional en todo momento.

A Esther por todo, por su ayuda, por su colaboración, por las explicaciones, por los ánimos que siempre me ha dado. Tengo claro que lo mejor de esta tesis es que me ha permitido conocerla.

RESUMEN

RESUMEN

ANTECEDENTES DE LA CUESTIÓN Y OBJETIVOS PROPUESTOS

La proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) es un péptido vasodilatador que parece mediar en la proliferación vascular, en el desarrollo de la inflamación de la enfermedad reumática y en las alteraciones nerviosas. Los objetivos de esta tesis fueron estudiar el papel de la PTHrP en la proliferación e inflamación de las CMLV en lesiones ateroscleróticas de un modelo experimental de conejos hiperlipidémicos, el mecanismo de actuación de la PTHrP y el papel modulador de la simvastatina sobre la PTHrP tanto *in vitro* como *in vivo*.

DESARROLLO DEL TRABAJO Y METODOLOGÍA

Se realizó un estudio en conejos blancos Nueva Zelanda. Un grupo de animales se sometió a un modelo de aterosclerosis experimental mediante la desecación endotelial de la arteria femoral con nitrógeno gaseoso y una dieta hiperlipidémica. El resto de los animales sirvieron como control. Por un lado, se estudió mediante inmunohistoquímica la localización celular de la PTHrP y su relación con la inflamación en placas ateroscleróticas y el efecto del tratamiento con simvastatina en dichas placas.

Por otro lado, se estudió mediante inmunohistoquímica la localización celular de la PTHrP y su relación con la inflamación en placas ateroscleróticas humanas de endarterectomía carotídea.

APORTACIONES DE CARÁCTER GENÉRICO O EXPERIMENTAL

Las placas de las carótidas humanas, se caracterizaron por un aumento de la expresión de PTHrP, PTH1R y MCP-1 en la zona de los hombros respecto a la cápsula. Las CMLV tratadas con PTHrP mostraron un aumento de la expresión génica y proteica del MCP-1 y una mayor activación del NF-kB. En cuanto a los conejos con dieta hiperlipemiente mostraron un aumento significativo de los niveles de colesterol total, VLDL e IDL, así como un aumento de la expresión de la PTHrP en las lesiones ateroscleróticas y del área de estenosis. Los cultivos con LDL aumentaron la expresión de PTHrP. El tratamiento con simvastatina redujo significativamente esta expresión.

En las placas de las carótidas humanas, la PTHrP parece actuar como mediador proinflamatorio de la lesión aterosclerótica y ser un factor de inestabilidad de la placa aterosclerótica. La LDL parece actuar como un mediador del aumento de la expresión de PTHrP en las placas ateroscleróticas de las arterias del grupo de animales hiperlipidémicos. Esta expresión se reduce cuando los animales son tratados con simvastatina.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| I INTRODUCCIÓN..... | 17 |
| 1- LA ATEROSCLEROSIS | 18 |
| 1.1 Estructura de la pared vascular..... | 19 |
| 1.2 Patogenia de la aterosclerosis | 20 |
| 1.2.1 Disfunción endotelial..... | 21 |
| 1.2.2 Progresión de la lesión..... | 22 |
| 1.2.3 Rotura de la placa..... | 23 |
| 2- PTHrP (Proteína relacionada con la parathormona)..... | 24 |
| 2.1 La PTHrP en el sistema cardiovascular..... | 25 |
| 2.1.1 En el corazón..... | 26 |
| 2.1.2 Como vasodilatador des sistema vascular periférico..... | 26 |
| 2.1.3 Como regulador de la proliferación de las CMLV..... | 26 |
| 3- EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B..... | 28 |
| 3.1 Proceso de activación del NF- κ B..... | 28 |
| 3.2 NF- κ B y aterosclerosis..... | 30 |
| 4- LOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA HMG-COA REDUCTASA..... | 31 |
| 4.1 Las estatinas como tratamiento de la aterosclerosis | 32 |
| II OBJETIVOS..... | 35 |

| | |
|---|----|
| III MATERIALES Y MÉTODOS | 37 |
| 1- ESTUDIOS IN VITRO..... | 38 |
| 1.1 Reactivos..... | 38 |
| 1.2 Cultivos celulares..... | 38 |
| 1.3 Extracción de ARN y análisis por <i>Northern blot</i> | 38 |
| 1.4 Estudios de PCR a tiempo real (PCR _Q)..... | 39 |
| 1.5 Análisis de <i>Western blot</i> | 39 |
| 1.6 Estudios de transfecciones transitorias..... | 39 |
| 2- ESTUDIOS EN EL MODELO EXPERIMENTAL..... | 40 |
| 2.1 Inducción de la aterosclerosis | 40 |
| 2.2 Sacrificio de los animales y recogida de muestras..... | 41 |
| 2.3 Perfil bioquímico en suero..... | 42 |
| 2.4 Inmunohistoquímica..... | 42 |
| 2.5 Análisis de la imagen..... | 43 |
| 3- ESTUDIOS EN PACIENTES | 44 |
| 3.1 Recogida de muestras..... | 44 |
| 3.2 Inmunohistoquímica..... | 44 |
| 3.3 Cuantificación..... | 45 |
| 4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 45 |

| | |
|---|-----|
| IV- RESULTADOS | 46 |
| 4.1 ESTUDIOS IN VIVO (placas de endarterectomía carotídea humana)..... | 47 |
| 4.1.1 Inmunohistoquímica de PTHrP, PTH1R y MCP-1 en placas ateroscleróticas humanas..... | 47 |
| .. | |
| 4.2 ESTUDIOS IN VITRO (primera parte)..... | 50 |
| 4.2.1 Expresión de MCP-1 en CMLV estimuladas con la PTHrP..... | 50 |
| 4.2.2 Mecanismos involucrados en la expresión de MCP-1 inducida por la PTHrP (1-36) en CMLV..... | 51 |
| 4.2.3 Efecto inhibidor de la HMG-CoA reductasa, Simvastatina, en el ARNm de la MCP-1 inducido por la PTHrP (1-36)..... | 53 |
| 4.3 ESTUDIOS EN UN MODELO DE ATHEROSCLEROSIS EN CONEJO..... | 55 |
| 4.3.1 Niveles de lípidos en plasma y análisis morfométrico de las lesiones femorales..... | 55 |
| 4.3.2 Estudio de la inflamación en la neointima femoral mediante Inmunohistoquímica de PTHrP..... | 57. |
| 4.4 ESTUDIOS IN VITRO (segunda parte)..... | 60 |
| 4.4.1 Expresión de la PTHrP en CMLV estimuladas con LDL nativas..... | 60 |
| 4.4.2 Modulación de la expresión de la PTHrP inducida por las LDLn en CMLV y la reversión por mevalonato y GGPP..... | 61 |
| 4.4.3 Modulación de la proliferación de CMLV humanas silenciando la PTHrP..... | 62 |
| V DISCUSIÓN | 66 |
| VI CONCLUSIONES | 73 |
| VII BIBLIOGRAFÍA..... | 76 |

ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En algunos casos, se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

| | |
|------------------|---|
| - AA | Ácido araquidónico |
| - AAS | Ácido acetil salicílico o aspirina |
| - ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| - AP-1 | Proteína activadora 1 |
| - BSA | Albúmina de suero bovino |
| - CMLV | Células de músculo liso vascular |
| - COX | Ciclooxigenasa |
| - EDTA | Ácido etilendiamino tetraacético |
| - EMSA | Ensayo de movilidad electroforética |
| - FPP | Farnesil pirofosfato |
| - GGPP | Geranilgeranil pirofosfato |
| - HDL | Lipoproteína de alta densidad |
| - HMG-CoA | 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A |
| - ICAM-1 | Molécula de adhesión intracelular-1 |
| - IDL | Lipoproteínas de densidad intermedia |
| - IFN- γ | Interferón gamma |
| - Ig | Inmunoglobulina |
| - I κ B | Subunidad inhibidora de NF- κ B |
| - IL | Interleuquina |
| - LDL | Lipoproteína de baja densidad |
| - LDLox | Lipoproteína de baja densidad oxidada |
| - MAPK | Proteínas quinasas de la familia MAP |
| - MCP-1 | Proteína quimioattractante de monocitos -1 |
| - MMP | Metaloproteasas de matriz |
| - MVA | Mevalonato |
| - NF- κ B | Factor nuclear- κ B |
| - PAI-1 | Inhibidor del activador del plasminógeno -1 |
| - PBS | Suero salino tamponado con fosfato |
| - PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |

| | |
|-----------------|---|
| - PKA | Proteína quinasa A |
| - PKC | Proteína quinasa C |
| - PTH | Paratohormona |
| - PTHrP | Proteína relacionada con la paratohormona |
| - RNAm | Ácido ribonucleico mensajero |
| - TNF- α | Factor de necrosis tumoral- α |
| - TF | Factor Tisular |
| - VCAM-1 | Molécula de adhesión de células vasculares -1 |
| - VLDL | Lipoproteínas de muy baja densidad |

I- INTRODUCCIÓN

1.- LA ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis constituye la primera causa de morbilidad en los países occidentales ocasionando trastornos tan importantes como la cardiopatía isquémica, los accidentes cerebrovasculares y la arteriopatía periférica. Todo esto resulta un problema no sólo médico-científico, sino social. En España la tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular es de las más bajas del mundo occidental (García-Gil, 1989), sin embargo, más del 40% del total de los fallecimientos son debidos a un proceso de origen cardiovascular.

Al referirnos a la enfermedad aterosclerótica como causa número uno de mortalidad, hay que tener en cuenta que es una enfermedad generalizada con afectación de distintos territorios. En este sentido, de 100 pacientes en los que la primera manifestación de la enfermedad es un infarto de miocardio, el 20% tendrá un evento cerebrovascular en los diez años siguientes; si se inicia con un accidente cerebrovascular, el 34% desarrollará un problema coronario en ese mismo periodo de tiempo. Además de la pared arterial, hay que tener en cuenta la importancia de la sangre, ya que si ésta tiene elementos que favorecen la enfermedad, lógicamente se transmitirán a todas las zonas. Esta relación entre los distintos territorios irrigados por vasos que llevan el mismo contenido sanguíneo es lo que nos indica que estamos ante una enfermedad sistémica.

Se podría definir como un proceso de origen multifactorial en el que se identifica una lesión típica denominada placa de ateroma, constituida por un depósito lipídico recubierto de tejido conectivo y distintos tipos celulares como las células de músculo liso vascular (CMLV), células infiltrantes (monocitos/macrófagos, linfocitos T) y plaquetas. La formación y desarrollo de la lesión se caracteriza por una respuesta inflamatoria en la pared vascular que consta de diferentes etapas: disfunción endotelial y formación de la estría grasa, progresión de la lesión, rotura de la placa y trombosis. El estudio de las diferentes moléculas proinflamatorias presentes en la lesión vascular y su regulación farmacológica puede contribuir a comprender mejor los mecanismos implicados en el desarrollo de la placa de ateroma.

1.1.- Estructura de la pared vascular

La alteración que da lugar a este tipo de enfermedades es la afección del árbol vascular, conocida como “arteriosclerosis”, caracterizada por un proceso generalizado, relacionado con la edad, y que se presenta como un aumento difuso del grosor de las capas íntima y media de las arterias, con pérdida de elasticidad de las mismas.

Podemos definir la aterosclerosis como un proceso multifactorial que cursa con la formación de engrosamientos focales de la íntima arterial, compuestos por acumulación de lípidos, células y tejido fibroso, dando lugar a las llamadas placas de ateroma. Las placas de ateroma son el resultado de una respuesta inflamatoria y fibroproliferativa exagerada a distintos tipos de agresión al endotelio y al músculo liso de la pared vascular. Su formación es un proceso lento, a lo largo de años, que afecta inicialmente a la capa íntima arterial, y, secundariamente, a la capa media.

Las arterias sanas están formadas por tres capas (Figura 1):

- Capa íntima: la íntima presenta una capa de células endoteliales que reviste la superficie interna del vaso. Este endotelio se apoya en la capa subendotelial, que consiste en tejido conjuntivo muy delicado y que puede presentar CMLV dispersas. La capa íntima presenta también una membrana elástica interna, que es la capa más externa de la íntima, que la separa de la media. Esta membrana, tubular y perforada, permite la difusión de los metabolitos de la sangre para nutrir las células de la pared arterial, situadas externamente.
- Capa media: Formada principalmente por células musculares lisas, dispuestas circularmente, a las que se agregan cantidades variables de elastina, colágeno y proteoglicanos. Las células musculares lisas, metabólicamente muy activas, son responsables de la síntesis de la matriz extracelular. La media posee también una lámina elástica externa, que la separa de la capa de adventicia.
- Capa adventicia: Consta principalmente de fibras de colágeno y elásticas. Esta capa se continúa con el tejido conjuntivo que envuelve los órganos próximos. También podemos encontrar los vasa vasorum, que desempeñan una función nutritiva de la adventicia y de la media.

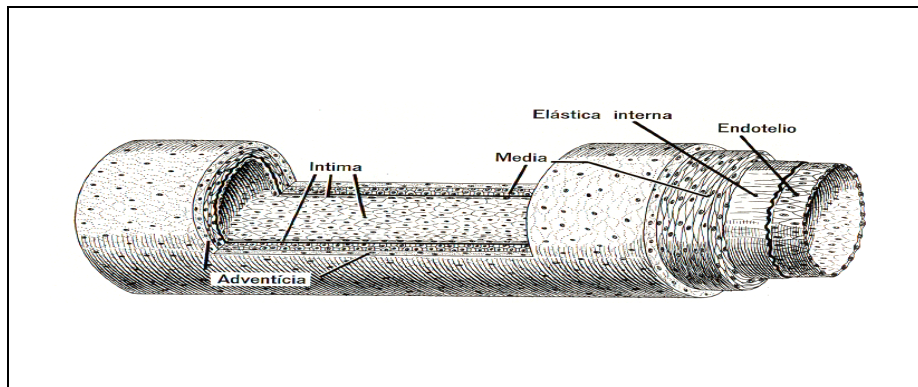


Figura 1: Estructura de la pared arterial (Reproducido de Junqueira y Carneiro 1987).

1.2.- Patogenia de la Aterosclerosis

Actualmente, la hipótesis más aceptada sobre el origen de la aterosclerosis es la llamada hipótesis de la respuesta a la agresión (Ross, 1996), donde se propone que diversos factores mecánicos, químicos, biológicos, tóxicos, inmunológicos y otros, pueden ser capaces de provocar una lesión en el endotelio vascular. Esta lesión se denominada disfunción endotelial y da lugar a una respuesta especializada por parte de monocitos y linfocitos T. El daño prolongado sobre el endotelio conlleva a un proceso inflamatorio crónico que contribuye a la formación de la placa aterosclerótica.

Básicamente, el desarrollo de la lesión se caracteriza por tres estadios:

- Macrófagos (ricos en lípidos) y linfocitos T se acumulan para formar la estría grasa.
- Posteriormente, ésta puede progresar a una lesión fibroadiposa con acúmulo de macrófagos y CMLV que migran desde la capa media.
- Finalmente, se forma la placa fibrosa, compuesta de tejido conectivo sobre un núcleo lipídico y de células necróticas.

Las placas fibrosas pueden sufrir una rotura que ponga en contacto el núcleo lipídico, altamente trombogénico, con el torrente circulatorio, dando así lugar a la formación de un trombo que impida el flujo sanguíneo.

1.2.1.- Disfunción Endotelial

Los factores que provocan la disfunción endotelial son desconocidos, siendo candidatos potenciales los denominados factores de riesgo cardiovascular: las dislipemias, la hipertensión, el tabaco y la diabetes. También están los llamados factores hemodinámicos, pues se sabe que el endotelio se daña en los lugares donde hay más turbulencias de la sangre (Niebauer, 1996). Además, se han propuesto otros factores como infecciones virales o bacterianas, e hiperhomocisteinemia (Ross, 1999).

En particular, destaca el papel que juegan los lípidos. Habitualmente, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) entran a través de las uniones intercelulares de la pared arterial y se acumulan en el espacio subendotelial en cantidades que son reguladas por el endotelio y probablemente por la lámina elástica interna (Penn, 1993). El aumento en los niveles plasmáticos de las LDL da lugar a un incremento de estas partículas en determinados lugares.

Debido a la tendencia de las LDL a unirse a los proteoglicanos, se incrementa el tiempo de residencia de estas moléculas en el espacio subendotelial (Tozer, 1997) y aumenta la probabilidad de oxidación, probablemente debido a la producción de radicales libres por el endotelio adyacente, por las CMLV y/o macrófagos (Morel, 1984). Se generan así las LDL oxidadas (LDLox), que pueden activar al endotelio (Rangaswamy, 1997) y estimular la expresión de moléculas de adhesión (van der Wal, 1992) y la secreción de sustancias quimiotácticas, como la proteína quimiotáctica para monocitos (Cushing, 1990), favoreciendo la adhesión y migración de células circulantes y de CMLV hacia la íntima (Chatterjee, 1992).

La transmigración subendotelial de monocitos da lugar a un incremento de estas células en la íntima, donde son expuestos a diversos factores secretados por las propias células endoteliales y por las CMLV, lo que provocará su activación y diferenciación a macrófagos. Las LDL modificadas son reconocidas por los receptores basurero o "scavengers" (Steinberg, 1997) que se encuentran en los macrófagos y en las CMLV. Este receptor, al no estar regulado por el contenido de colesterol intracelular, conlleva a una sobrecarga de lípidos en los macrófagos y las CMLV, formándose "las células espumosas" (Mitchinson, 1994). La acumulación de estas células da lugar al primer paso de la aterosclerosis, la estría grasa (Figura 2).

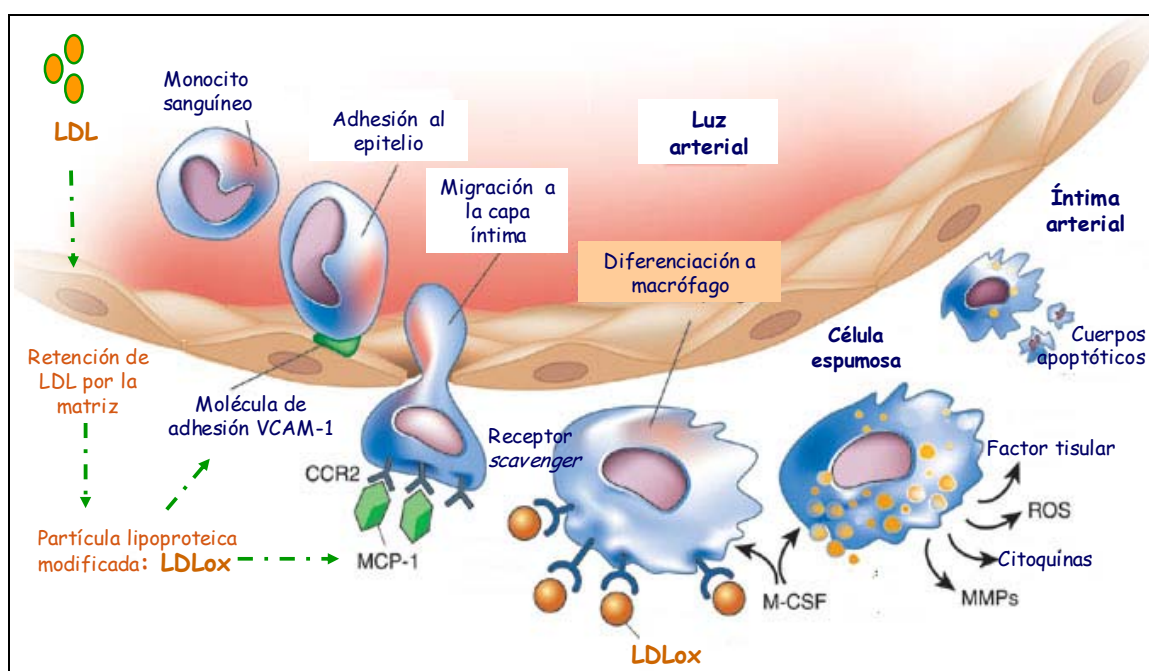


Figura 2. Mecanismos implicados en la disfunción endotelial (Reproducido de Peter Libby 2002)

1.2.2.- Progresión de la lesión.

Después de la formación de la estría grasa, la continua acumulación de lípidos, de productos liberados por los macrófagos y de radicales libres de oxígeno da lugar a un mayor daño endotelial, acompañado por citolisis. Por otro lado, las plaquetas, los monocitos y las células endoteliales liberan factores mitogénicos que estimulan la migración, proliferación y síntesis de matriz extracelular por parte de las CMLV. Todo ello da lugar a que la lesión progrese hacia una placa madura. La ingesta continuada de LDLox por las células espumosas provoca finalmente su rotura, vertiendo su contenido lipídico al medio extracelular, formándose un núcleo lipídico avascular e hipocelular recubierto por una matriz extracelular rica en colágeno y elastina y por CMLV denominada cápsula fibrosa.

La pérdida de CMLV, posiblemente por apoptosis (Geng, 1995) junto con la liberación de factores como IFN- γ (Asno, 1989) conduce a la reducción de la síntesis de colágeno. Además los macrófagos liberan metaloproteinasas capaces de degradar el colágeno que forma la cápsula. Este desequilibrio entre síntesis y degradación de colágeno debilita la placa y la hace vulnerable, y predispuesta a la rotura.

1.2.3.- Rotura de la placa.

La presencia de un proceso inmuno-inflamatorio en la placa aterosclerótica es considerada un mecanismo decisivo que conduce a la desestabilización, rotura y subsecuente formación de un trombo, que es la base de las consecuencias clínicas más severas de la aterosclerosis. En el 70 % de los enfermos que presentan un síndrome vascular agudo ocurre este proceso de rotura de placa. Normalmente se trata de una placa que no estenosa mucho el vaso, que contiene grasa y que al producirse una fisura en la placa, pone en contacto el núcleo lipídico, rico en factor tisular, con la sangre (Fernández-Ortiz, 1994; Toschi, 1997).

Hay dos tipos principales de factores que favorecen la rotura de la placa: los físicos y los químicos. Entre los físicos cabe destacar la presión arterial, el diámetro de la arteria, el impacto de la presión de la sangre que circula contra la placa o la densidad del núcleo lipídico. Los factores químicos provienen principalmente de los macrófagos. En este sentido cabe destacar que las zonas de rotura de placa están caracterizadas por un elevado componente de macrófagos (Moreno, 1994). Además, este grupo también comprobó que las placas muy estenosantes, que provocaban angor inestable, contenían muchos más macrófagos. Los macrófagos son capaces de liberar enzimas proteolíticas que podrían degradar la cápsula de la lesión aterosclerótica, facilitando su rotura (Matrisian, 1992). Además de estos mecanismos inflamatorio-proteolíticos, en los últimos años está cobrando gran importancia la presencia de hemorragia intraplaca y la neovascularización en la progresión, desestabilización y rotura de la placa (Figura 3)

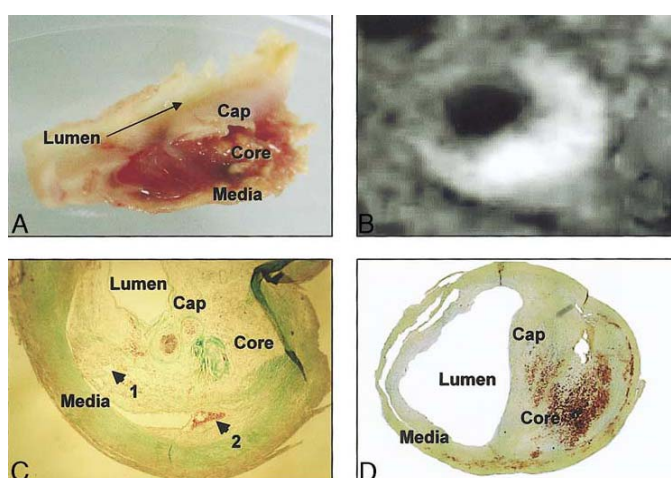


Figura 3. Aspecto histológico de una placa de ateroma carotídea. (A) Aspecto macroscópico de una placa carotídea mostrando una hemorragia intraplaca. (B) Resonancia magnética mostrando una placa carotídea con

hemorragia intraplaca caracterizada por una captación de contraste en T1 con una señal hiperintensa. (C) Tinción tricromica de Masson de una placa carotídea mostrando la presencia de: 1)neocapilares dentro de la lesión y 2) hemorragia intraplaca en el core. Este ejemplo muestra la heterogeneidad de la lesión, encontrando patología en diferentes estados: fibrosis y hemorragia. (D) Tinción roja de Alizarin mostrando la presencia de calcificación en el core y en la interfase entre el core y la media. (Tomada de Houard , 2006)

2.- PTHrP (Proteína Relacionada con la Paratohormona)

La proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) fue aislada y secuenciada en 1987 en el estudio del síndrome paraneoplásico de la hipercalcemia maligna. Posteriormente se ha descubierto su estructura genética (Yang, 1996, Strewler, 1996), la regulación de la expresión de los genes, el proceso postranslacional, los receptores implicados y la función fisiológica normal.

El término PTHrP deriva del hecho de que los 13 primeros aminoácidos de la región N-terminal son homólogos a los de la PTH con la misma posición y actúa mediante un único receptor PTH/PTHrP. Sin embargo la PTH solamente se produce en los tejidos de la glándula paratiroidea y sistema nervioso central, actuando en la regulación del calcio en el hueso y a nivel renal, mientras que la PTHrP puede producirse virtualmente en cualquier célula y tiene una amplia gama de funciones que tienen poco que ver con la homeostasis del calcio.

La PTHrP es el producto de un único gen con 9 exones que, por procesamiento alternativo del ARNm, da lugar a tres isoformas distintas de 139, 141 y 173 aminoácidos. Estas son iguales en las posiciones 1-139 y difieren solamente en la terminación carboxi-terminal con funciones fisiológicas distintas (Figura 4).

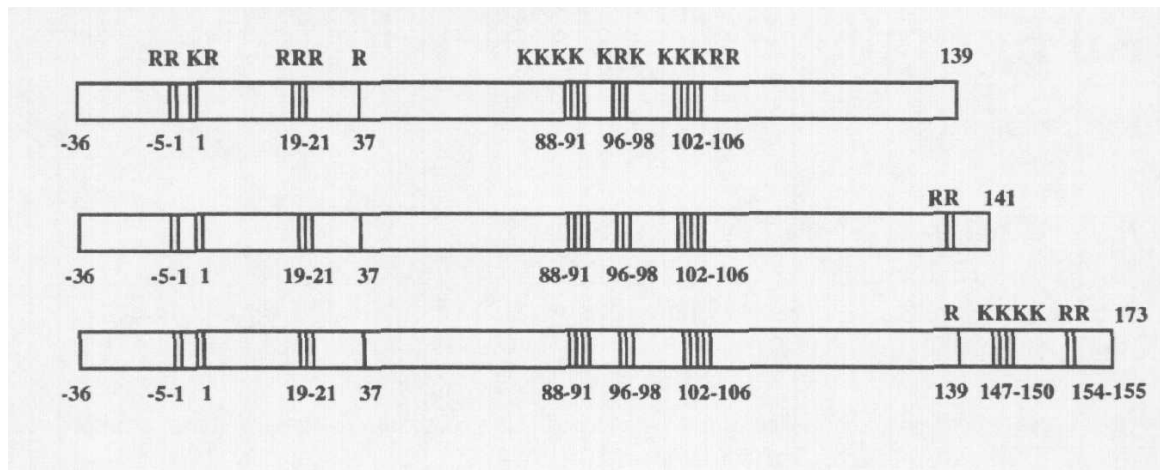


Figura 4. Tres productos traslacionales iniciales de la PTHrP Diagrama del árbol de los productos de traslación inicial de la PTHrP y de las formas secretoras maduras que resulta del proceso de traslación. Las tres formas son idénticas excepto por su parte carboxi-terminal. (Reproducida de Wysolmerski, 1998)

Las funciones de la PTHrP se pueden dividir en 4 categorías:

- Estimular el transporte del calcio transepitelial.
- Relajante del músculo liso.
- Regula la proliferación celular, diferenciación y apoptosis.
- Regular procesos de diferenciación celular en el feto o en recién nacidos.

La PTHrP parece actuar a dos niveles: mediante receptores de superficie celular o mediante interacción con el ADN nuclear. El proceso por el cual la PTHrP accede al citoplasma y de ahí al núcleo, aún no ha sido completamente dilucidado, pero parece depender del tipo de célula (Lam, 2000). Esta molécula presenta distintas funciones en órganos como el hueso y el riñón, en procesos como el desarrollo embrionario o el cáncer y también en el sistema cardiovascular.

2.1 La PTHrP en el sistema cardiovascular

Aunque el estudio de la PTHrP en el sistema cardiovascular se encuentra en fases iniciales parece que tiene distintas funciones como:

- Hormona cardiaca
- Vasodilatador
- Regulador en la proliferación del músculo liso.

2.1.1 En el corazón

Es producida en los miocitos auriculares y ventriculares (Massfeler, 1996). Se ha encontrado que pueden intervenir en el desarrollo cardíaco durante el periodo embrionario y primeros años de vida, mientras que esas funciones se transforman en el adulto. Así maniobras como la distensión o el aumento del trabajo auricular o ventricular, parecen aumentar su expresión y su efecto sería estimular la contracción cardíaca.

2.1.2 Como vasodilatador en el sistema vascular periférico

Los niveles de PTHrP están estimulados en el músculo liso vascular en respuesta a mecanismos de distensión de la pared arterial, incremento de la tensión arterial y a vasoconstrictores como la angiotensina II. Es también un potente vasodilatador en distintos territorios como el renal, coronario, pulmonar, mesentérico y sistema nervioso central (Mok, 1989). Estos efectos están mediados por la activación de la adenilil ciclasa en las CMLV y la producción de óxido nítrico (Massfelder, 1996) y se deben a la interacción de la PTHrP con su clásico receptor PTH/PTHrP el cual está expresado en las CMLV.

2.1.3 Como regulador de la proliferación de las células del músculo liso vascular

La expresión de la PTHrP se incrementa en el árbol vascular en respuesta a la distensión, a la vasoconstricción y a la distensión vascular con balón (Ozeki, 1996). Lo que sí se sabe es que no es esencial en el desarrollo cardiovascular. El grupo de Pirola (Pirola, 1993) y el equipo de Massfelder (Massfelder, 1997) demostraron que la PTHrP (1-36) y PTHrP (1-141) inhiben la proliferación de células del músculo liso vascular en cultivos primarios de aorta de ratas, lo cual sugiere que su expresión durante el daño vascular podría disminuir la proliferación de estas células y por tanto disminuir la reestenosis. Sin embargo, la introducción de PTHrP por transferencia génica en las células del músculo liso vascular estimula la proliferación. Parece que la PTHrP contiene una señal de localización nuclear en los aminoácidos 87-107 la cual es suficiente para transportarla al núcleo (Massfelder, 1999) y las secuencias carboxi-terminal de esta señal son cruciales para sus efectos proliferativos en las células del músculo liso vascular (de Miguel, 2001) (Figura 5).

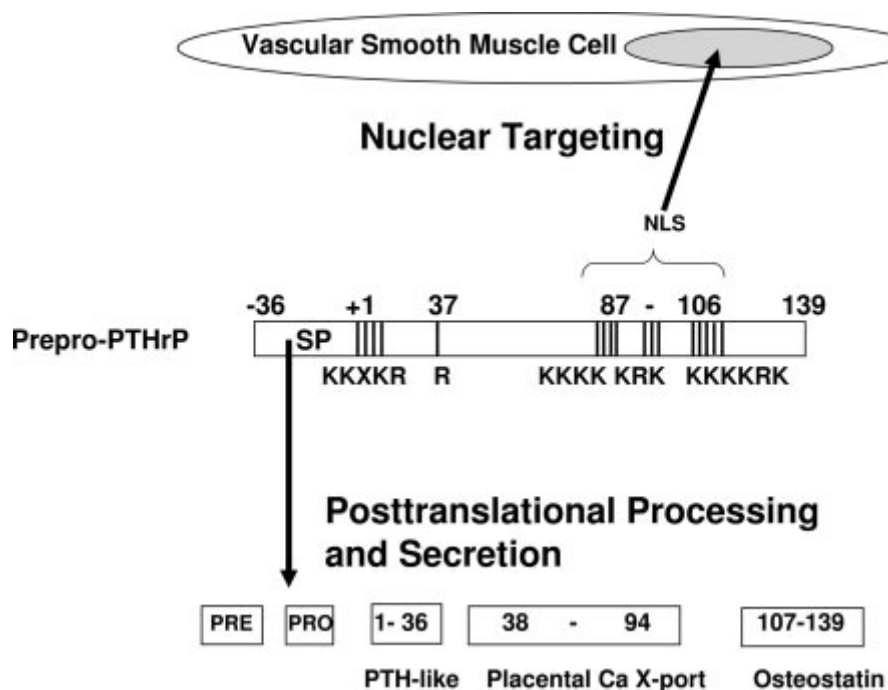


Figura 5. Representación esquemática del tráfico bidireccional de la PTHrP en las células del músculo liso arterial. La PTHrP contiene una señal de localización nuclear en el dominio 87-106, el cual es rico en lisina (K) y arginina (R). La PTHrP puede también llevar un camino secretor, en cuyo caso estas y otras K y R se usan como sustratos convertidores de la prohormona en una generación de péptidos derivados. (Reproducida de Fiaschi-Taesch, 2006)

Así, el verdadero papel de la PTHrP en el sistema vascular aún no ha sido establecido. Hay estudios que sugieren que la PTHrP puede actuar como citoquina proinflamatoria (Funk, 2001). La sobreexpresión de la PTHrP se da en humanos y en lesiones ateroscleróticas experimentales en relación con la severidad de la enfermedad y puede estar involucrada en los procesos inflamatorios de la aterosclerosis.

3.- EL FACTOR DE TRANSCRIPCION NF- κ B

En los últimos años se están empezando a describir con detalle los mecanismos que regulan la activación de uno de los factores de transcripción más importantes en la regulación de las proteínas implicadas en los procesos inflamatorios: el factor nuclear- κ B (NF- κ B) (Barnes, 1997). El NF- κ B fue identificado inicialmente como un factor nuclear unido al promotor de la cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas en linfocitos B, de donde proviene su denominación. Con posterioridad, se ha descrito su presencia en casi todos los tipos celulares, si bien habitualmente se encuentra secuestrado en el citoplasma en forma inactiva. Tras la estimulación adecuada, el NF- κ B es liberado de la subunidad inhibidora ($\text{I}\kappa\text{B}$) y traslocado al núcleo (Henkel, 1993), donde promueve la actividad transcripcional de determinados genes. La señal de activación concluye con la nueva síntesis de la subunidad inhibidora $\text{I}\kappa\text{B}$. Es interesante destacar que la propia expresión génica de $\text{I}\kappa\text{B}$ se encuentra bajo el control de NF- κ B, dando lugar a una retroalimentación negativa (Figura 6).

En mamíferos, la forma activa de NF- κ B se presenta como un homo o heterodímero de los 5 miembros de la familia NF- κ B-Rel: p50/p105, p65/RelA, c-Rel, RelB y p52/p100 (Barnes, 1997). El dímero que se encuentra más habitualmente se compone de las subunidades p50 y p65. Todas las proteínas de la familia presentan una zona característica por la que se unen a una secuencia consenso del ADN o sitio κ B: GGGRNNYYCC, en la que R es una purina, Y una pirimidina y N cualquier base. Se ha demostrado que sólo el 'knockout' de p65 es incompatible con la vida, sugiriendo que existe cierta redundancia funcional en varios de los componentes de la familia (Karin, 1999).

3.1.- Proceso de activación del NF- κ B

La activación de NF- κ B puede producirse como consecuencia de una gran variedad de estímulos tanto fisiológicos, como patológicos (Figura 6). En primer lugar, tras la estimulación, se produce la rápida fosforilación y poliubiquitinación de $\text{I}\kappa\text{B}$ y su degradación proteolítica por el proteosoma en escasos minutos. Como resultado, las secuencias de localización nuclear de NF- κ B quedan expuestas y se produce su traslocación al núcleo celular. En general, los estímulos proceden de la activación de receptores de membrana que, mediante otras proteínas adaptadoras, (v.gr. TRAF) activan una cascada de fosforilación de proteínas (proteín-quinasas de la familia MAP) que conduce a la activación de la cinasa responsable de la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}$ (IKK) (Karin, 1999).

Además, es bien conocido que en esta activación participan especies reactivas del oxígeno en algún punto no determinado. Una vez en el núcleo, los diferentes dímeros de la familia NF- κ B se unen con afinidad variable a los genes correspondientes produciendo distintos grados de transactivación. Esta variedad proporciona una sutileza adicional en la regulación selectiva de diferentes genes en respuesta a distintos estímulos en diferentes estirpes celulares. Asimismo, los dímeros NF- κ B no producen la transcripción de modo aislado, sino como parte de un complejo de coactivadores. Por último, NF- κ B interactúa con otros factores de transcripción de modo positivo o negativo. Uno de los factores de transcripción más a menudo asociado a NF- κ B es la proteína activadora 1 (AP-1). Tanto NF- κ B como AP-1 se activan en respuesta a ciertos estímulos proinflamatorios, pero divergen en la respuesta al estrés oxidativo. El NF- κ B actúa de modo sinérgico con otros factores de transcripción como el factor nuclear IL-6 (NF-IL6) en la estimulación de diversos genes 'inflamatorios'. Por otro lado, es importante señalar que se han utilizado diversos fármacos para modular la activación de NF- κ B en diversos procesos inflamatorios (antioxidantes, inhibidores de proteasas, etc). Recientemente han surgido productos naturales con potencial antiinflamatorio; entre ellos esta el partenolide, una lactona que proviene de plantas medicinales indias y que es capaz de prevenir la degradación del I κ B. Así, nuestro grupo ha demostrado que el tratamiento con partenolide es capaz de reducir las lesiones renales mediante la inhibición de NF- κ B y de la expresión de diversos genes regulados por él (López-Franco, 2002).

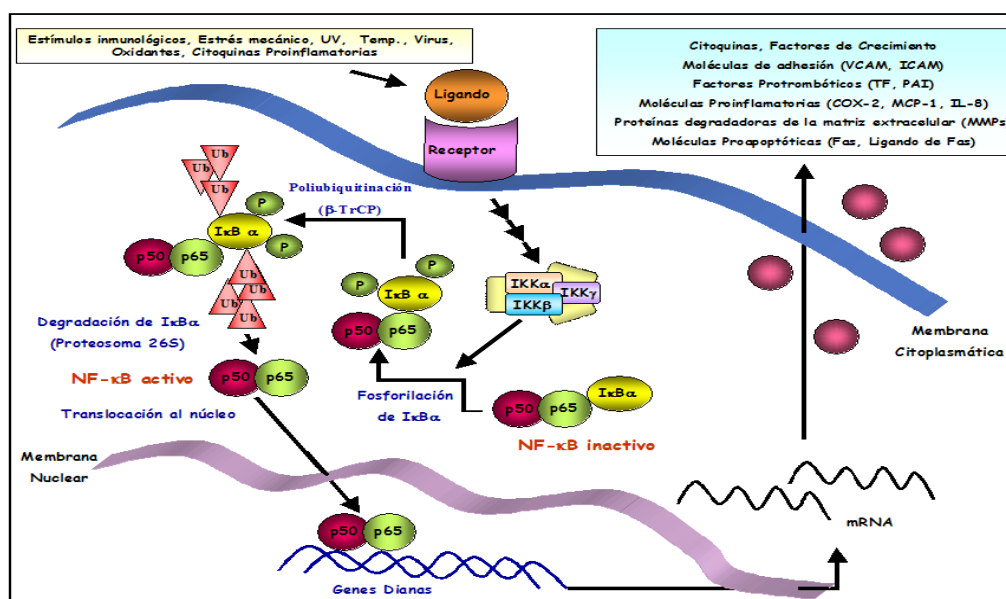


Figura 6. Mecanismo de activación de NF- κ B.

3.2.- NF- κ B y aterosclerosis.

Un gran número de estudios ha demostrado que diversas sustancias presentes en el microambiente de la placa ateromatosa pueden inducir la activación de NF- κ B en células de la pared vascular. En este sentido, diversos factores de riesgo involucrados en el estado inflamatorio de las arterias como la dislipemia, la hipertensión o la diabetes mellitus se han relacionado con el proceso de activación de NF- κ B (Collins, 2001). Tanto las lipoproteínas nativas como las oxidadas, así como las VLDL, inducen la activación de NF- κ B y la expresión de genes proinflamatorios por parte de células endoteliales, CMLV y monócitos-macrófagos (Kahn, 1995, Brand, 1997, Dichtl, 1999). Por otro lado, la Angiotensina II, además de ser un potente vasoconstrictor, se ha visto que es capaz de actuar como una citocina proinflamatoria y promover la activación de NF- κ B y la expresión de MCP-1 en CMLV y monocitos (Ruiz-Ortega, 2000). Por último, tanto la hiperglucemia per se como la presencia de productos avanzados de glicosilación de proteínas pueden contribuir a la activación de NF- κ B en células endoteliales y CMLV (Yerneni, 1999, Schmidt, 1999). Se había demostrado previamente la presencia de NF- κ B activo en placas ateroscleróticas humanas (Brand, 1996) mediante el empleo de anticuerpos que reconocen la forma activa de NF- κ B (zona de p65 por la que se une a I κ B). Se ha localizado NF- κ B activo en los núcleos de CMLV, endoteliales y macrófagos, sugiriendo la importancia de la citada activación en todas las estirpes celulares. Por el contrario, en el vaso normal, se detecta NF- κ B en forma inactiva en el citoplasma de las células. Nuestro grupo ha descrito la activación de NF- κ B en diversos modelos experimentales de daño vascular (Hernández-Presa, 1997, Hernández-Presa, 1998). Además, se ha observado una mayor presencia de NF- κ B activo en las zonas de flujo turbulento (bifurcaciones, curvaturas) que de este modo estarían predispuestas al desarrollo de la lesión ante la presencia de nuevos estímulos de activación de NF- κ B (Hajra, 2000). Las células endoteliales expuestas a fuerzas mecánicas (incluido el flujo no laminar) muestran activación de NF- κ B (Mohan, 1997). Los mecanismos moleculares por los que las fuerzas físicas inducen la activación de NF- κ B son desconocidos, si bien se supone que pueden implicar algún modo de transducción de la fuerza mecánica dependiente de integrinas.

Nuestro grupo ha demostrado que una dieta rica en grasa es capaz de inducir activación de NF- κ B en células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos (Blanco-colló, 2000). Asimismo, las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diabetes presentan un

incremento en la activación del NF- κ B (Hofmann, 1999) y del ARNm de la subunidad p65 del NF- κ B en relación con sujetos sanos (Bierhaus, 2001). Además de las respuestas iniciales tras dieta grasa y el desarrollo de la aterosclerosis, la activación de NF- κ B también parece clave en el desarrollo de las complicaciones cardiovasculares. Recientemente, han demostrado que este factor está presente preferentemente en células procedentes de placas ateroscleróticas humanas responsables de un síndrome coronario agudo (Wilson, 2002), reforzando la hipótesis de la relación entre inflamación e inestabilidad de la placa de ateroma. Además, se ha observado la activación de NF- κ B en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con angina inestable, frente a la ausencia de activación en pacientes con aterosclerosis severa pero sin síndrome coronario agudo (Ritchie, 1998).

4.- LOS INHIBIDORES DE LA HMG-COA REDUCTASA

Las evidencias experimentales y epidemiológicas que asocian los niveles de colesterol elevados, especialmente el colesterol LDL (c-LDL), con un riesgo aumentado de enfermedad coronaria (La Rosa, 1990; Pekkanen, 1990) han provocado un enorme interés en el desarrollo de fármacos que reduzcan este riesgo. De este modo la inhibición de la síntesis de colesterol se ha convertido en uno de los objetivos principales del desarrollo farmacéutico.

A pesar de su reciente introducción para el uso clínico, los fármacos hipolipemiantes han demostrado una alta eficacia en reducir la incidencia de eventos isquémicos (Brown, 1996). Concretamente, las estatinas disminuyen la mortalidad total y la debida a eventos coronarios, tanto en prevención primaria (Shepherd, 1995) como secundaria (The 4S investigators, 1994). Estos efectos no son explicables por la escasa reducción en la progresión de las lesiones ateroscleróticas que consiguen (Brown, 1996) y se han atribuido a una posible acción estabilizadora de la placa. Por otra parte, los inhibidores de la HMG-CoA reductasa han demostrado, en modelos experimentales, que son capaces de estabilizar la placa aterosclerótica (Dowell, 1995; Shiomí, 1995).

Unas de las razones por las que la terapia dietética tiene una efectividad limitada para reducir los niveles de colesterol, es que la mayor parte de éste no se ingiere con la comida, sino que es fabricado en el hígado mediante un proceso biosintético. Las estatinas reducen los niveles de colesterol al inhibir la enzima limitante en la ruta de biosíntesis de este: la conversión de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) en mevalonato mediante la enzima HMG-CoA reductasa

(Figura 7). El bloqueo de esta enzima provoca la depleción en las células de derivados del ácido mevalónico, entre los que cabe destacar los isoprenoides (Goldstein, 1990).

La disminución de la producción de colesterol endógeno provoca un aumento en la expresión de receptores de LDL en la superficie de los hepatocitos, lo que dará lugar a un incremento en la captación de LDL por la célula y a una disminución en los niveles de colesterol totales.

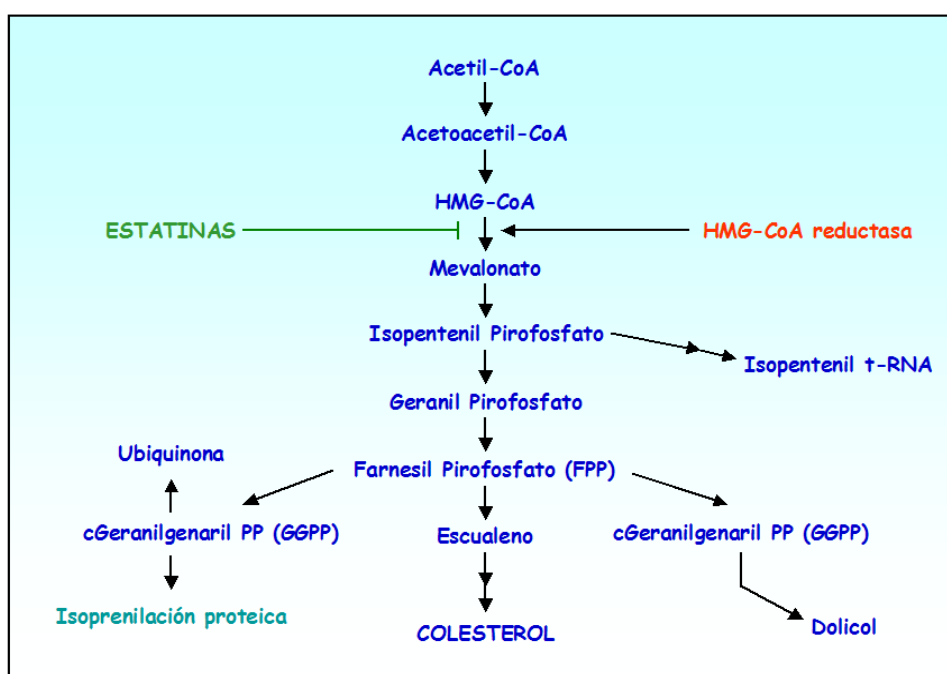


Figura 7. Ruta de síntesis del colesterol y el efecto de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa.

4.1.- Las estatinas como tratamiento de la aterosclerosis

El tratamiento de la aterosclerosis es un campo de investigación muy activo, donde se van diseñando nuevos fármacos que están siendo ensayados tanto a nivel experimental como a nivel clínico. Las estatinas tienen una estructura de anillo similar al mevalonato diferenciándose en su forma activa que puede ser con anillo abierto y con carácter hidrofílico (pravastatina y fluvastatina) o

anillo cerrado y con carácter hidrofóbico (lovastatina y simvastatina). Estas características les confieren distintos niveles de eficacia (Bocan, 1994; Davignon, 1992). Por otro lado, algunos estudios sugieren que los niveles elevados de triglicéridos plasmáticos también se correlacionan con un mayor riesgo de enfermedad coronaria, en especial cuando este tipo de dislipemia se asocia a unos niveles bajos de colesterol HDL (Assmann, 1992; Patsch, 1992). En este sentido, estudios previos implican a los niveles elevados de triglicéridos con el aumento de algunos factores de coagulación (VII_c, VIII_c y X_c) y con un aumento del PAI-1 (Silverio, 1994; Asplund-Carlson, 1993). Todo esto ha conducido a la obtención de una nueva estatina denominada atorvastatina que, además de reducir los niveles de colesterol total y LDL, disminuye los triglicéridos (Bocan, 1994).

Los datos experimentales y los obtenidos en ensayos clínicos preliminares sugieren que las estatinas constituyen herramientas importantes para tratar la hipercolesterolemia y para la prevención de la aterosclerosis. Un punto de interés reciente reside en el potencial efecto antiinflamatorio de ciertos fármacos hipolipemiantes. In vitro, las estatinas son capaces de disminuir la expresión de ICAM-1 en monocitos humanos y en células endoteliales (Niwa, 1996; Takeuchi, 2000). Además, en un modelo de aterosclerosis en conejo, se observó que el tratamiento con atorvastatina disminuía la expresión de MCP-1, efecto relacionado con la disminución del infiltrado inflamatorio (Bustos, 1998). El mecanismo por el cual las estatinas disminuyen la expresión de MCP-1 probablemente está relacionado con la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- κ B. Asimismo, el tratamiento con estatinas también provoca la disminución de la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Hernandez-Presa, 2002). Esta isoforma de la COX fue primero relacionada con la fisiopatología de enfermedades reumáticas inflamatorias y con el incremento en la producción de la prostaglandina quimioattractante E₂ (PGE₂) (Simon, 1999). Después, se confirmó que este proceso era similar en la pared vascular, apareciendo en lesiones ateroscleróticas y siendo prácticamente indetectable en vasos sanos (Schonbeck, 1999). También es importante destacar el efecto de estos fármacos sobre diversos marcadores inflamatorios séricos. En concreto, las estatinas son capaces de disminuir los niveles de proteína C reactiva en pacientes hiperlipidémicos (Baumann, 1994) así como los niveles MMP-9 (Kalela, 2001) o los de las citocinas TNF- α o IL-1 β (Solheim, 2001; Ferro, 2000).

En los últimos años se han propuesto mecanismos beneficiosos independientes del efecto hipolipemiante de las estatinas. Entre ellos, la disminución en los valores plasmáticos de la proteína C reactiva observada tras el tratamiento con diferentes estatinas no se ha relacionado con la reducción de las concentraciones lipídicas (Ridker, 2001). Mediante estudios in vitro se ha observado que los efectos independientes de la disminución de colesterol se relacionan con la

inhibición de otros intermediarios isoprenoides como el farnesil pirofosfato (FPP) y el geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (Goldstein, 1990), cuya síntesis también es inhibida tras el tratamiento con estatinas. El FPP y el GGPP son utilizados para la modificación postraducciona de diferentes proteínas, incluidas las proteínas G pequeñas como Ras y las relacionadas con Ras (Rac, Rab y Rho), entre otras (Van Aelst, 1997). La unión del isoprenoide a estas proteínas es necesario para su anclaje a la membrana plasmática y su correcta funcionalidad. La inhibición de la isoprenilación provoca un acúmulo de estas proteínas en el citosol como formas inactivas, efecto observado tras la incubación con estatinas (Blanco-Colio, 2000). Estas proteínas están implicadas en diferentes funciones celulares, entre las que se encuentran la regulación de la expresión génica, la organización del citoesqueleto celular, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular programada o apoptosis (Mackay, 1998, Zohn, 1998). La inhibición de Rho y por lo tanto de su quinasa, la Rho quinasa, es un posible mecanismo que puede mediar los llamados efectos pleiotrópicos de las estatinas en la pared vascular, dado que cambios en Rho afectan al transporte intracelular, la estabilidad del ARNm de algunos genes y la transcripción génica (Takemoto, 2001). Entre los efectos anti-inflamatorios de las estatinas relacionados con la inhibición de la isoprenilación proteica cabe destacar que la inhibición de la activación de NF- κ B inducida por sustancias proinflamatorias como el TNF- α y la angiotensina II en CMLV se ha relacionado con la disminución de isoprenoides, ya que la presencia de FPP o GGPP bloquea el efecto inhibitorio de atorvastatina (Ortego, 1999).

II- OBJETIVOS

La proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) tiene una amplia gama de funciones. Entre ellas se encuentran: La estimulación del transporte del calcio transepitelial, la relajación del músculo liso, la regulación de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis y la regulación de los procesos de diferenciación celular en el feto o en recién nacidos. La PTHrP parece actuar a dos niveles: mediante receptores de superficie celular o mediante interacción con el ADN nuclear.

Aunque el estudio de la PTHrP en el sistema cardiovascular se encuentra en fases iniciales, se ha demostrado la sobreexpresión de esta proteína en las placas ateroscleróticas humanas y en lesiones ateroscleróticas experimentales en relación con la severidad de la enfermedad. Parece que la PTHrP tiene distintas funciones en dicho sistema como: hormona cardiaca, vasodilatadora y reguladora en la proliferación del músculo liso.

En esta tesis estudiamos:

1. La expresión de la PTHrP en placas ateroscleróticas humanas y su asociación con mecanismos inflamatorios.
2. El papel de la PTHrP en la proliferación e inflamación de células del músculo liso vascular, así como en lesiones ateroscleróticas de un modelo experimental de conejos hiperlipidémicos.
3. El papel modulador de la simvastatina sobre la PTHrP y sus efectos en placas ateroscleróticas de un modelo experimental de conejos hiperlipidémicos.

III- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- ESTUDIOS IN VITRO

1.1- Reactivos

Se empleó medio DMEM, penicilina, estreptomycin, tripsina y FBS de BioWhittaker. Las LDL nativas (LDL_n, densidad 1.019-1.063 g/ml) se aislaron del plasma de individuos normocolesterolémicos mediante ultracentrifugación diferencial. Durante la manipulación y almacenamiento de las LDL, se tuvo especial cuidado con la prevención de la oxidación de las mismas. El contenido de la endotoxina, medido con un kit de ensayo de endotoxina (Pharmingen), fue menor (< 1 ng/ml) a los niveles de detección. Se utilizaron LDL comerciales, mevalonato (MVA), farnesil pirofosfato (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (Sigma). La simvastatina utilizada se obtuvo de Merck. A esas dosis testadas, ni las LDL_n ni la simvastatina produjeron un efecto tóxico o muerte por apoptosis en las células (analizado mediante el estudio de la morfología celular y mediante citometría de flujo). El reactivo de transfección utilizado fue el FuGENE (Roche).

1.2- Cultivos celulares

Las células de músculo liso vascular (CMLV) de rata se aislaron y cultivaron como previamente se ha descrito (Ortego, 1999). Las CMLV de aorta humana se adquirieron en ATCC (1999-CRL). Las células se incubaron en medio libre de suero durante 48 horas y se incubaron a continuación con los estímulos correspondientes. En algunos experimentos, la simvastatina se adicionó al medio 1 hora, con o sin MVA, FPP o GGPP (adicionados 2 horas antes del estímulo).

1.3- Extracción de ARN y análisis por *Northern blot*

El ARN se aisló de las células mononucleares de sangre periférica por el método del Trizol (Life technologies) y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm. Se comprobó además que la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm era próxima a 2, indicando la ausencia de contaminación proteica tras la RT-PCR, con 20 µg de ARN total desnaturalizado, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa –formaldehído y se transfirió a membranas de nylon (Genescreen) como se ha descrito previamente (Ortego, 1999). La PTHrP de rata y la GAPDH se obtuvieron de una RT-PCR preparativa.

Se realizó una transcripción reversa de 1 µg de ARN total a ADNc, y éste se sometió a sucesivos ciclos de amplificación en presencia de α -[³²P]-dCTP (Amersham), como se ha descrito

previamente (Ortego, 1999). Los productos de la PCR se sometieron a un gel de agarosa al 1% y se purificaron mediante un sistema de purificación (Wizard TM PCR Preps DNA Purification System , Promega). La cuantificación se expresó en unidades arbitrarias (U.A.)

1.4- Estudios de PCR a tiempo real (PCR₀).

Mediante el kit ADNc Archive de alta capacidad (Applied Biosystems), 1 µg del ARN total fue retrotranscrito para obtener ADNc total utilizando 2,5 U/µl de una transcriptasa reversa durante 2 h a 37°C. Como controles negativos se utilizaron muestras no retrotranscritas.

La cuantificación del ARN específico se realizó usando una PCR a tiempo real utilizando el Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). Se emplearon sondas TaqMan FAM específicas para PTHrP (Applied Biosystems) y se utilizó un ensayo prediseñado de ARN ribosomal (ARNr) 18S (Applied Biosystems) como control endógeno.

Todas las muestras se realizaron por duplicado.

1.5- Análisis por Western blot

Las células de diferentes condiciones experimentales, se recogieron y se realizaron los western blots de los extractos de proteínas celulares como se ha descrito previamente. Para comprobar la transferencia, los extractos se incubaron con suero anti-PTHrP de conejo y se rehibridaron con anticuerpo monoclonal frente a tubulina (B-5 Sigma). Las membranas se incubaron con anticuerpo de cabra frente a conejo conjugado a peroxidasa y con IgG frente a ratón. Las bandas se detectaron por un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Amersham), fueron expuestas a una película de rayos-X y se cuantificaron mediante densitometría.

1.6- Estudios de transfecciones transitorias.

El doctor Piero Crespo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid (España) nos aportó los plásmidos pcDNA3B (vector), Q63L Rho A (constitutivo, activo) y N19 Rho A (dominante, negativo). La transfección se llevó a cabo mediante el FuGENE 6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las CMLV humanas se transfectaron con un ARN de interferencia (si ARN) frente a PTHrP humano (Ambion) en medio Optimem siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 18 horas, se lavaron las células y se cultivaron en un medio complementado, y se deplecionaron 24 horas antes

de la adición de LDL. En estas condiciones, las células quiescentes (transfectadas o no con siARN PTHrP) se incubaron durante 24 horas con nLDL y se midió la proliferación con un método colorimétrico (azul de metileno).

2- ESTUDIOS EN EL MODELO EXPERIMENTAL

2.1- Inducción de la aterosclerosis

Se utilizaron trece conejos machos New Zealand (3.5-4 kg). Los animales permanecieron en jaulas individuales y se acomodaron a ellas durante siete días según la Guía del Cuidado y Uso de los animales de laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud Norteamericano. En el día cero, comenzaron a tomar una dieta aterogénica, 2% de colesterol y 6% de aceite de coco (Letica). Una semana después, se les indujo un daño endotelial por desecación con nitrógeno en las arterias femorales como previamente habíamos descrito [Bustos, 1998]. Después de una semana, los animales se aleatorizaron en dos grupos: el primero de ellos recibía 5 mg/kg/día de simvastatina (SV, n=7) mezclado con la dieta y el segundo grupo no recibía tratamiento (NT, n=6), manteniéndose en ambos casos la dieta aterogénica durante cuatro semanas. Es importante indicar que los conejos precisan dosis mayores de estatinas para obtener una reducción similar de los valores de lípidos que la que se observa en los pacientes. El peso de los animales se controló durante todo el protocolo para ajustar las dosis de la droga. Un tercer grupo de animales correspondía a los controles sanos que recibían una dieta estándar y no se les intervenía (Sanos, n=7) (Figura 8).

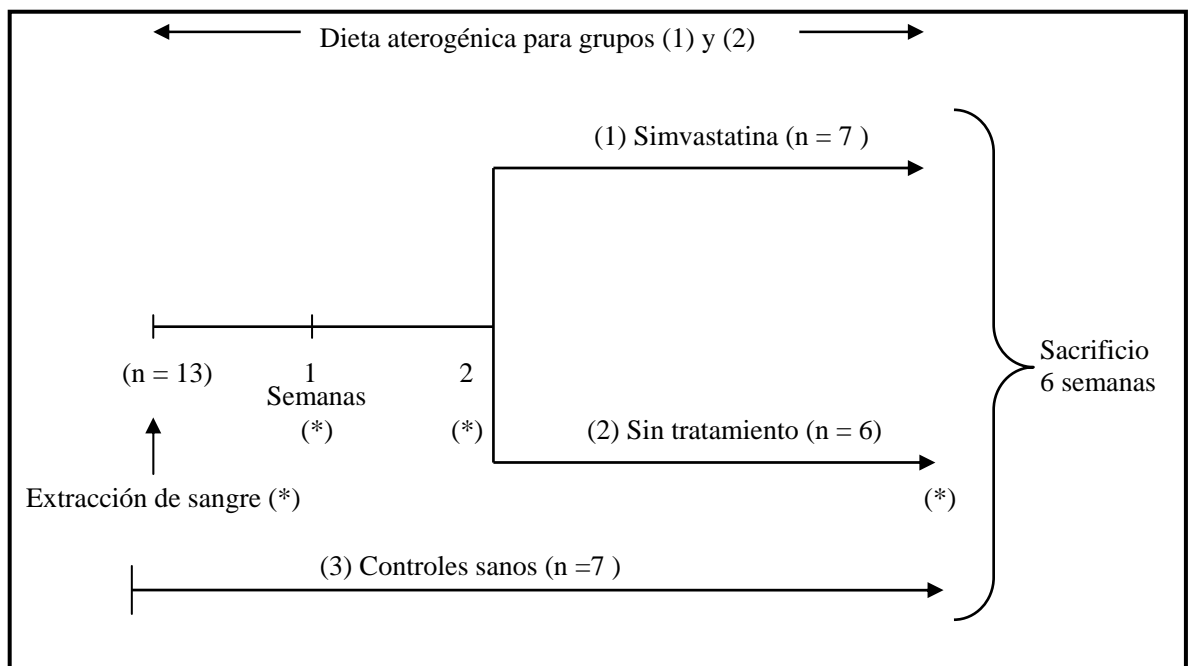
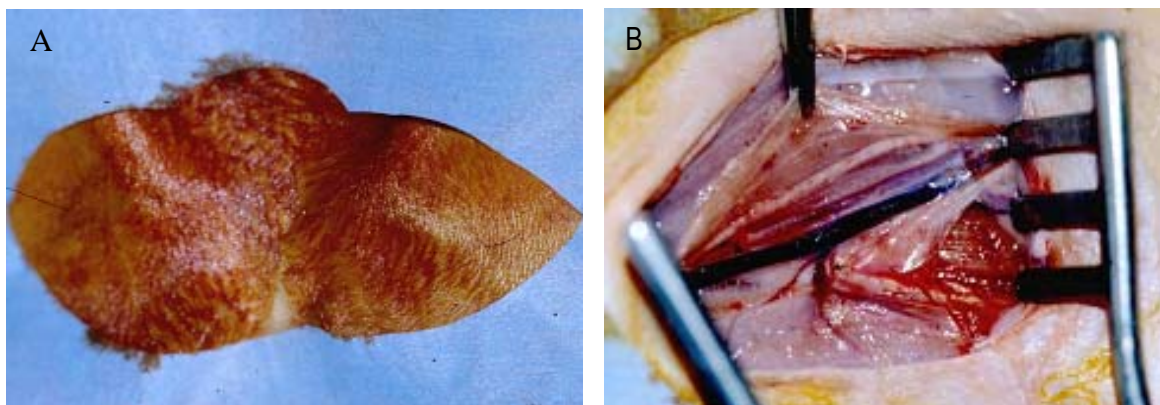


Figura 8: Modelo animal para la inducción de aterosclerosis

2.2-. Sacrificio de los animales y recogida de las muestras

En el momento del sacrificio, los animales fueron anestesiados y las arterias femorales se fijaron por perfusión desde la aorta descendente con formaldehído al 4% (fosfato sódico dibásico 9,1 mM, fosfato sódico monobásico 1,7 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) a 100 mm de Hg. Las arterias femorales se extirparon y se mantuvieron durante 24 h en formaldehído al 4% y después permanecieron en etanol al 70% hasta su inclusión en parafina. A continuación, se sacrificó a los animales por sobredosis cardiaca de pentotal sódico (Abbot, Madrid, España)(figura 9).



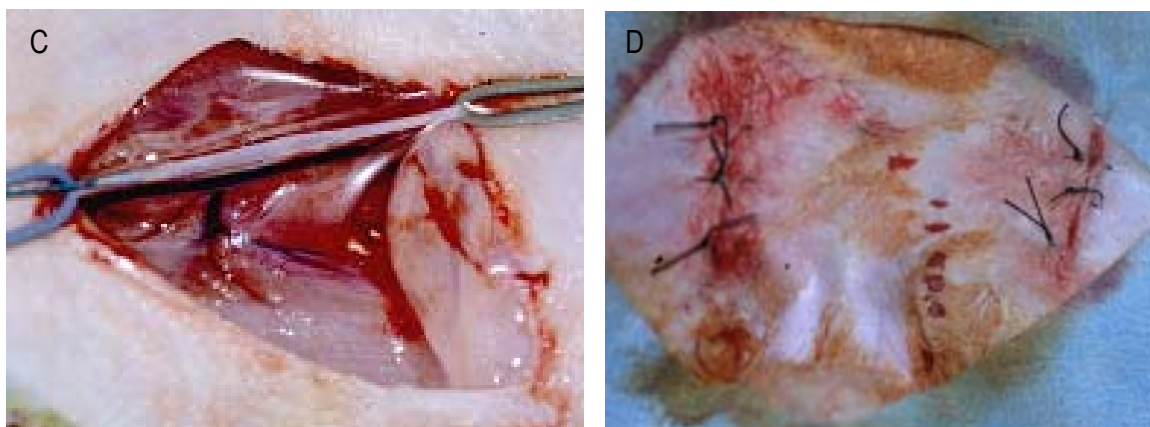


Figura 9: Esquema del modelo experimental: Fotografías representativas de la inducción del daño endotelial en la arteria femoral. A: esterilización de la zona a intervenir. B: aislamiento de la arteria femoral. C: la zona distal se canula y se infunde nitrógeno gas durante un minuto. D: sutura de la zona intervenida

2.3- Perfil bioquímico en suero

Para el análisis de los diferentes parámetros lipídicos se extrajo sangre de la vena marginal de la oreja de los conejos el día 0, al final de las semanas 1,2 (randomización) y en la 6 (sacrificio). Los animales permanecían 12h sin tomar comida. La medida del colesterol total (CT), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y triglicéridos (TG) se realizó mediante ensayos enzimáticos (Sigma Diagnostics, Madrid, España).

2.4- Inmunohistoquímica

Los cortes de los tejidos embebidos en parafina, se cortaron en 4 μ m en intervalos de 5-mm, se secaron y se hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol. La actividad de la peroxidasa endógena se anuló incubando los cortes en peróxido de hidrógeno al 3%: metanol (1:1) durante 30 min. A continuación se realizó la digestión enzimática con tripsina (Sigma, España) al 0,1% en Tris-HCL (50 mM con CaCl_2 al 0,01 pH 7,8) a una temperatura de 37°C durante 30 min. Seguidamente se eliminaron las uniones inespecíficas tratando los cortes durante 1 h. a temperatura ambiente con una solución de bloqueo (PBS con 4% de BSA y 6% de suero del huésped en que se obtuvo el anticuerpo secundario), y se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario (diluido en PBS con 4% de BSA)

Como anticuerpos monoclonales se utilizaron: un anticuerpo monoclonal para macrófagos de conejo (RAM-11, DAKO), un anticuerpo monoclonal para α -actina (HHF-35, Sigma), un anticuerpo policlonal frente a la región C-terminal de la molécula PTHrP y un anticuerpo purificado frente a PTH1R (AbVII, covance) como se ha descrito previamente. Para la inmunodetección de PTHrP, los tejidos se incubaron previamente en 0,02 U/mL de neuraminidasa (Sigma) durante 1 hora.

Como anticuerpos secundarios para PTHrP y PTHR1 se utilizó un anticuerpo porcino biotinilado anti IgG de conejo producido en cerdo (Amersham). En el caso de monocitos / macrófagos y CMLV se utilizó un anticuerpo biotinilado anti IgG de ratón producido en cabra (Dako). Después de la incubación, se añadió el complejo Estreptavidina-biotina/peroxidasa (StreptABComplex/MRPO, DAKO) durante 30 minutos para amplificar la señal. Como cromógeno se utilizó una solución de diaminobenzidina (DAB, DAKO, Carpintería, California, CA, EEUU) de 0,5 mg/ml en H₂O₂ al 0,02%. El tejido se contrastó con la tinción de hematoxilina, se deshidrató y se montó en medio Pertex (Meditex). Para detectar las uniones no específicas, cada muestra se incubó con su propio control negativo sin añadir el anticuerpo primario.

Para hacer estudios de colocalización se realizaron tinciones para macrófagos, CMLV y PTHrP en cortes seriados de una misma pieza del tejido. En cada experimento, se realizaron controles negativos sin el anticuerpo primario o usando la correspondiente IgG, para descartar la existencia de tinción no específica.

2.5- Análisis de la imagen

Las preparaciones de inmunohistoquímica se digitalizaron mediante el microscopio Olympus (BH-2) conectado a una videocámara CCD y las imágenes se analizaron mediante un programa informático Olympus. Las secciones que presentaban máxima lesión se eligieron para la cuantificación. Para el análisis morfométrico se midió el área de la íntima. Para la inmunohistoquímica, las áreas de la íntima con tinción positiva para PTHrP, PTHR1 y macrófagos de las secciones de la arteria, se segmentaron y se cuantificaron por unidad de área (mm²). De este modo, los resultados se expresaron como un porcentaje del área analizada.

3.- ESTUDIOS EN PACIENTES

3.1- Recogida de muestras

Veintiséis pacientes que iban a ser sometidos a una endarterectomía carotídea en nuestra Institución participaron en el estudio con el consiguiente consentimiento informado antes de su inclusión. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Fundación Jiménez Díaz de acuerdo con las guías institucionales.

Para el estudio, se seleccionaron las bifurcaciones carotídeas, ya que se trata de la zona más propensa para la formación de la placa aterosclerótica. En las placas carotídeas se estudiaron dos áreas diferentes (los hombros y la cápsula). La región de los hombros se definió como el área a ambos lados del núcleo lipídico y la cápsula fibrosa como la capa celular que se encuentra por encima del ateroma.

Las muestras de las placas se recogieron y se guardaron en paraformaldehído 24h y después se mantuvieron en etanol (70%) hasta ser incluidas en parafina. Todas las carótidas presentaron diferentes grados de calcificación y se descalcificaron en EDTA. Las muestras se cortaron en piezas de 5mm, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 4 μ m de grosor mediante el empleo de un micrómetro (Micrón, Francia). Los datos analizados se estudiaron en dos zonas diferentes de la lesión: los hombros y la cápsula

3.2- Immunohistoquímica.

Las muestras fueron desparafinadas y posteriormente rehidratadas. La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió incubando los cortes en peróxido de hidrógeno al 3%: metanol (1:1) durante 30 min. Posteriormente se incubaron con 0.02 U/mL neuraminidasa (Sigma) para la detección de la PTHrP y con tripsina para macrófagos y MCP-1. Las muestras se incubaron en tampón bloqueante con el 6% del suero correspondiente y 4% de suero de albumina bovina (BSA) en PBS durante 1h. Todos los anticuerpos primarios (anticuerpo monoclonal anti- macrófagos humanos, HAM-56, DAKO, anticuerpo monoclonal anti- α actina de músculo liso, HHF-35, SIGMA, anticuerpo policlonal anti- MCP-1 humano hecho en conejo de Immugenex y anticuerpo policlonal anti- PTHrP humana hecho en conejo) (1:100 in BSA/PBS) se diluyeron en 4% BSA en PBS y se incubaron durante toda la noche. El anticuerpo secundario se diluyó en 4% BSA y se incubó 1 h. Después, en los casos necesarios, se incubaron las muestras con el complejo ABC-HRPO (DAKO) durante 30 min. La localización del anticuerpo se determinó mediante la adición del cromógeno DAB (DAKO)

durante 10-15 min. Por último, se aplicó a las secciones una tinción de fondo con hematoxilina de Carazzi (Bio-Optica, Milán, Italia), se deshidrataron y montaron en DPX (BDH, Poole, Inglaterra). Para hacer los estudios de colocalización, se realizó una inmunofluorescencia para la PTHrP después de las tinciones de inmunohistoquímica para macrófagos y CMLV. Como anticuerpo secundario un anticuerpo conjugado con fluoresceína anticonejo hecho en cabra fue utilizado para la detección de la PTHrP y se montaron en glicerol al 90% en PBS. En cada experimento se realizaron controles negativos tanto sin el anticuerpo primario como usando la correspondiente IgG para comprobar que no existían tinciones inespecíficas.

3.3-Cuantificación

Las preparaciones se digitalizaron mediante la utilización de un microscopio Olympus (BH-2) conectado a una vídeo cámara CCD. El análisis de imagen lo realizó el Dr. Luis Ortega (Patólogo del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España) usando el software de Olympus Cue-2. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas por mm² en las zonas de los hombros y de la cápsula.

4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos *in vitro* se realizaron al menos 3 veces. Los datos se expresan como la media \pm DE. La comparación de los valores correspondientes a los distintos grupos se realizó por el test de Mann-Whitney. Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPAD InStat (GraphPAD Software) Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

IV- RESULTADOS

1- ESTUDIOS IN VIVO (placas de endarterectomía carotídea humana)

1.1-Inmunohistoquímica de PTHrP, PTH1R y MCP-1 en placas ateroscleróticas humanas.

Para analizar la posible relación de la PTHrP en la formación y desarrollo de la aterosclerosis, estudiamos su presencia y localización en las distintas células de las placas carotídeas de endarterectomía. Así, hemos encontrado que las placas ateroscleróticas humanas contienen una mayor infiltración de macrófagos y células T y menor de CMLV en la región de los hombros que en la cápsula fibrosa. Sin embargo no hay diferencias significativas en el número total de células teñidas positivas para macrófagos y CMLV cuando comparamos estas dos regiones. La tinción para PTHrP, PTH1R y MCP-1 fue significativamente mayor en la región de los hombros que en la cápsula (0.75 ± 0.1 versus 0.29 ± 0.04 , 0.5 ± 0.1 versus 0.25 ± 0.05 , 0.72 ± 0.2 versus 0.29 ± 0.05 , respectivamente con $P < 0.05$ para todas las tinciones). (Figura 10). Para asegurar la especificidad de la técnica, realizamos controles negativos omitiendo los correspondientes anticuerpos primarios o usando la correspondiente IgG. Para la PTHrP también usamos la preincubación del anticuerpo primario C13 con (Cys²³) humana PTHrP amina, el inmunogen usado para hacer este anticuerpo y no hubo tinción en ninguno de los casos.

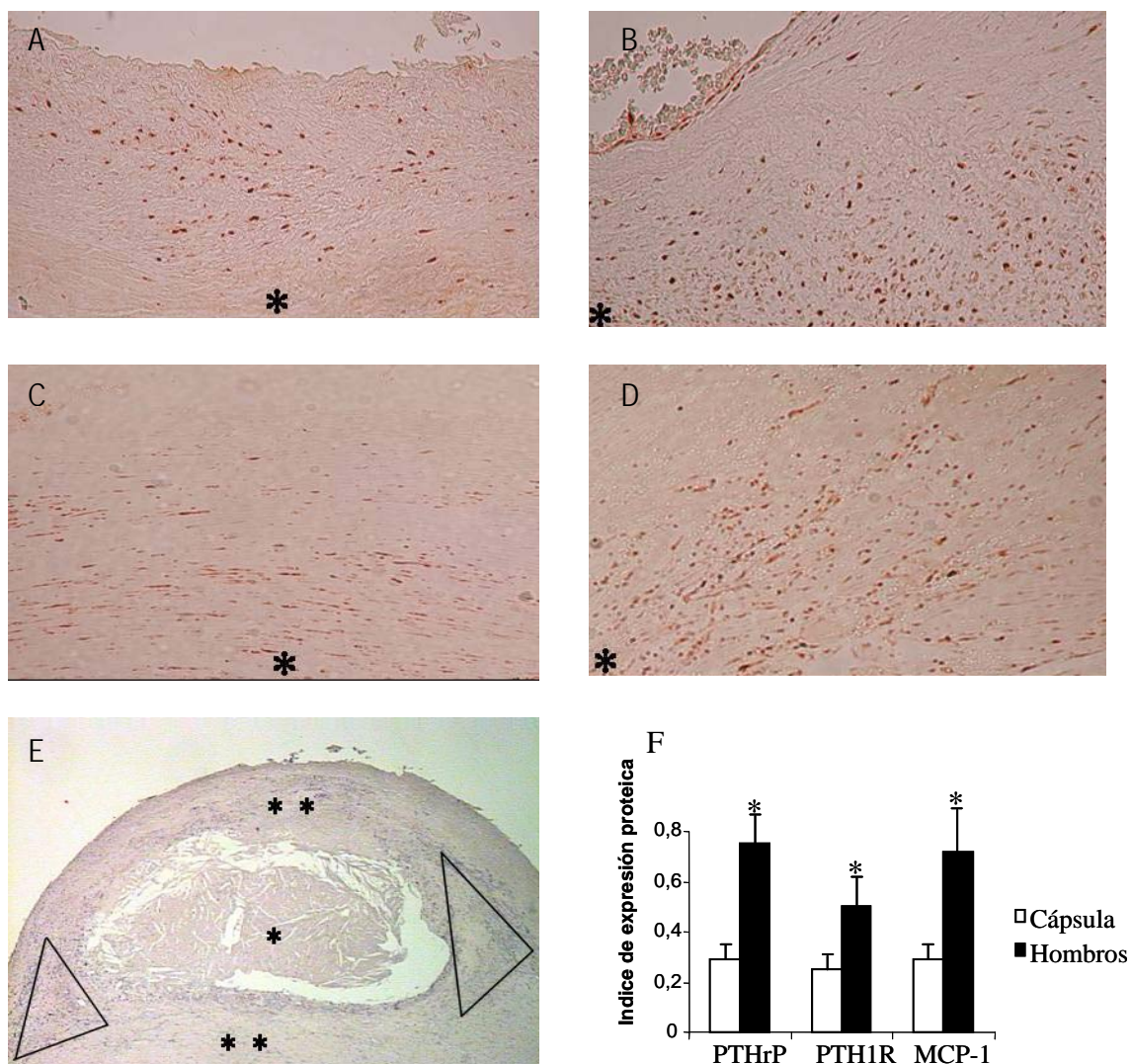


Figura 10 Inmunodetección de PTHrP, PTH1R, y MCP-1 en placas ateroscleróticas humanas. La positividad para PTHrP y PTH1R está aumentada en la región de los hombros (B, D), que en la cápsula (A, C). La positividad para MCP-1 se vio también aumentada en la región de los hombros (F). (E) Representación esquemática de una placa aterosclerótica carotídea, señalando la región del ateroma por un asterisco y la de la cápsula por dos asteriscos. La región de los hombros se señala por dos triángulos.

Además realizamos un procedimiento de doble tinción, usando inmunoperoxidasa/inmunofluorescencia, para determinar el tipo celular que contribuye a la sobreexpresión de PTHrP en placas ateroscleróticas humanas. De esta forma la presencia de la PTHrP fue detectada en CMLV (Figura 11A y 11 B) y macrófagos (Figura 11C y 11 D). Además la inmunohistoquímica para PTHrP y MCP-1 en secciones seriadas de tejido mostraron la presencia de ambas proteínas en las mismas células (Figuras 11E y 11F). Estos resultados sugieren que ambas proteínas PTHrP y MCP-1 están probablemente implicadas en el proceso inflamatorio de la región vulnerable de las placas ateroscleróticas humanas.

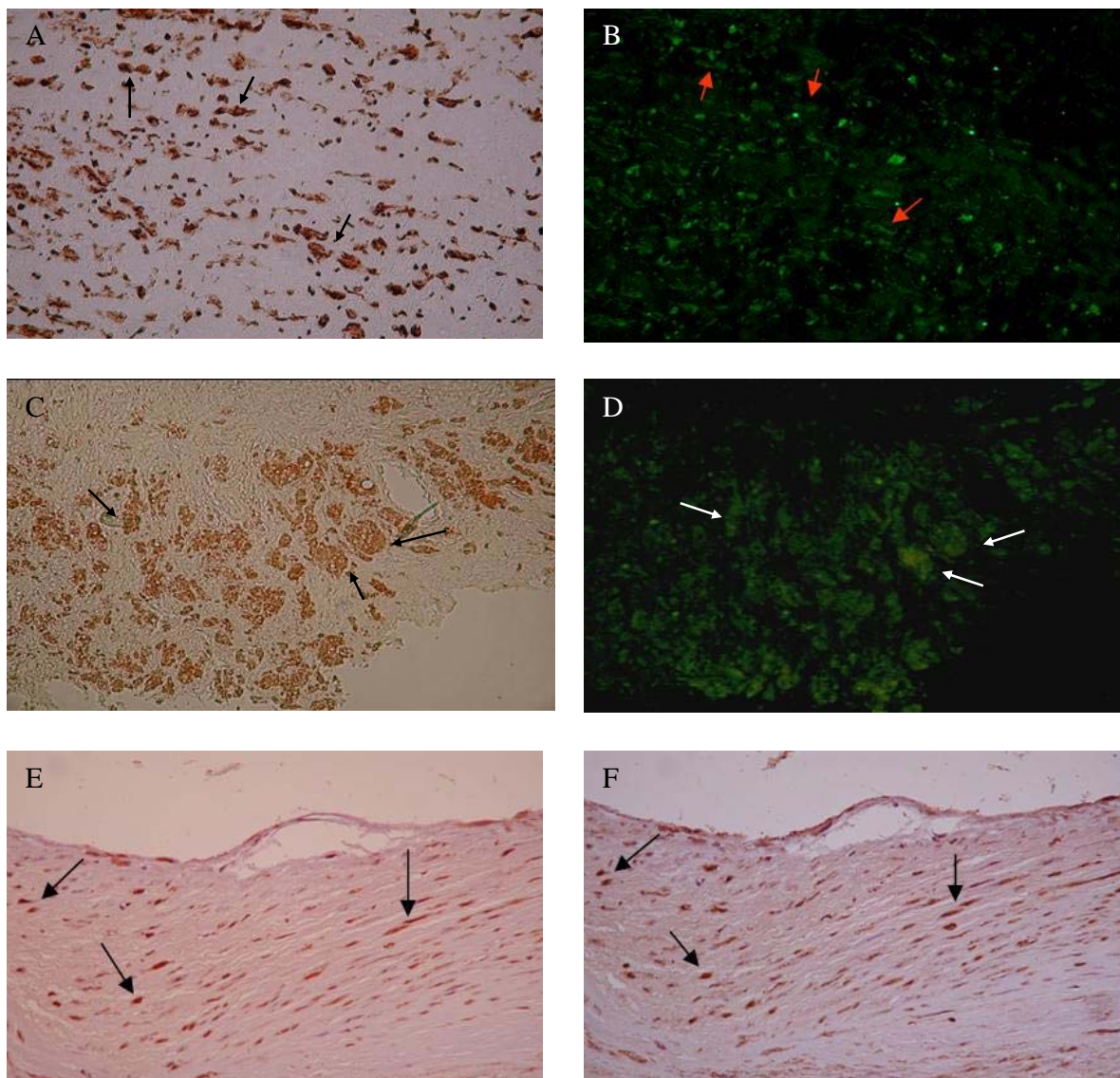


Figura 11. Estudios de colocalización. Se realiza una doble inmunotinción con anticuerpos específicos para CMLV (A) o macrófagos (C) y anti-PTHrP antisuero C13 (B, D). Las flechas indican la doble tinción para PTHrP (verde) y para CMLV o macrófagos (marrón). La inmunotinción para PTHrP (E) y MCP-1 (F) se realizó en secciones seriadas de placa ateromatosa

2- ESTUDIOS IN VITRO (Primera parte)

2.1-La PTHrP estimula la expresión de MCP-1 en CMLV

Dado que la MCP-1 y PTHrP fueron localizadas en las placas ateroscleróticas humanas, estudiamos el potencial efecto proinflamatorio de la PTHrP en cultivos de CMLV. La PTHrP (1-36) a 10^{-8} mol/l aumentó el ARNm de MCP-1 (con una estimulación máxima a las 6 horas, siendo 3 veces sobre el control) y la proteína MCP-1 (aproximadamente 2,5 veces sobre el control a las 24 horas) (Figura 12). Estos resultados sugieren que la PTHrP puede ser un nuevo mediador involucrado en el reclutamiento de células mononucleares en la lesión ateromatosa a través de la inducción de MCP-1

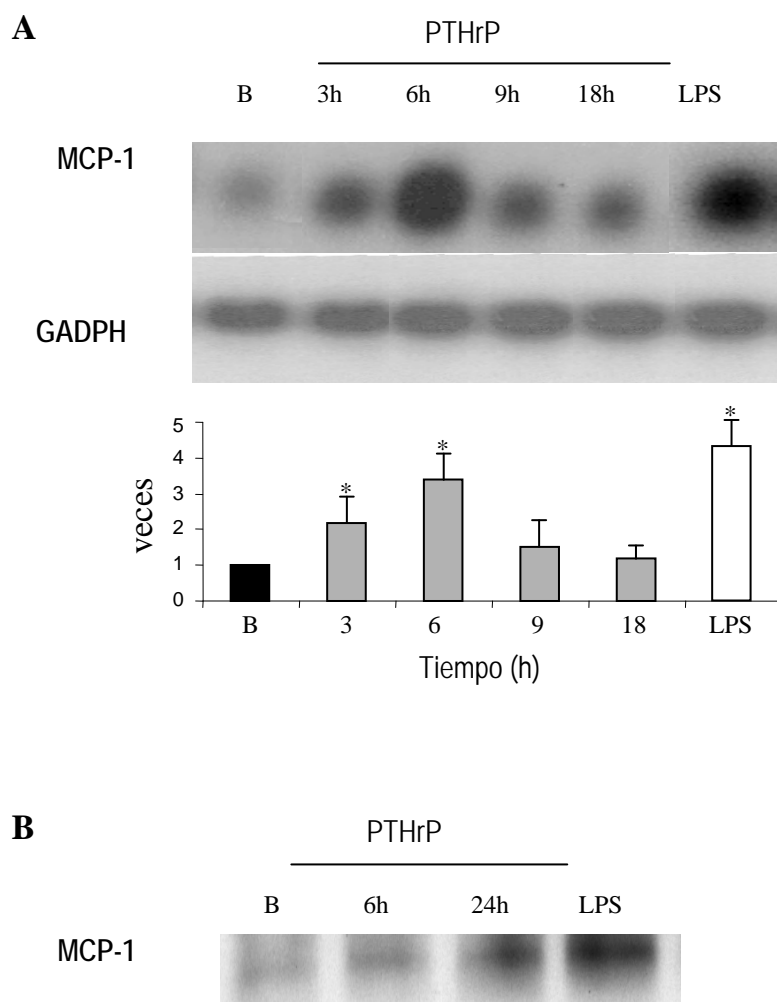


Figura 12. La PTHrP (1-36) induce un aumento de la expresión de MCP-1 en CMLV. Las CMLV fueron deplecionadas durante 48 horas y entonces se trataron con PTHrP (1-36) (10^{-8} mol/L) a diferentes periodos de

tiempo. El Lipopolisacárido (LPS) (1 µg/mL) se usó como control positivo. A, Northern blot representativo correspondiente a MCP-1 y GAPDH ARNm y valores densitométricos relativos a 3 experimentos independientes * $P < 0.05$ vs valor basal. B, Western blot representativo donde se detecta MCP-1 con un anticuerpo específico anti-rata para MCP-1.

2.2-Mecanismos involucrados en la expresión de la MCP-1 inducida por la PTHrP (1-36) en CMLV

En la siguiente parte analizamos el posible mecanismo involucrado en la inducción del ARNm de la MCP-1 por la PTHrP (1-36). Como este péptido puede estimular el AMPc en CMLV, inicialmente medimos el efecto de dos inhibidores de la proteína quinasa A. Ambos, RpcAMPS y H89, a 5×10^{-5} y 10^{-7} mol/L, respectivamente, inhibieron la expresión del gen de MCP-1 inducido por la PTHrP a las 6 horas (Figura 13). Además el tratamiento previo con PTHrP(7-34), a 10^{-6} mol/L, el cual estimula la proteína quinasa C pero no la proteína quinasa A por interacción con el PTHR1, anula el ARNm de MCP-1 inducido por la PTHrP (1-36) mientras no tuvo efecto cuando se incubó solo (Figura 13).

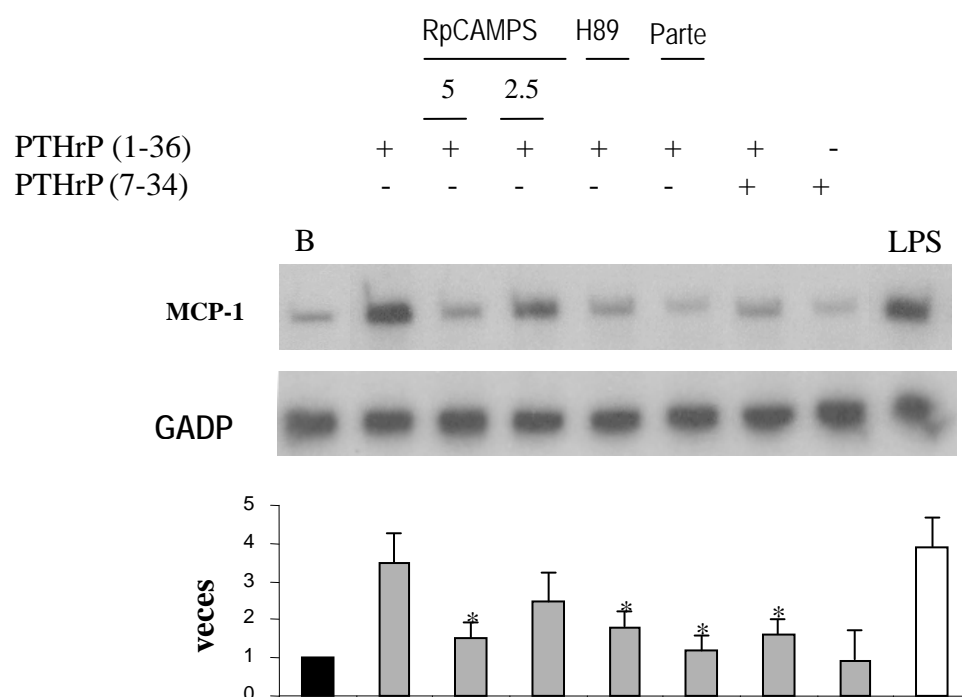


Figura 13. Mecanismos involucrados en la sobreexpresión del ARNm de MCP-1 inducido por la PTHrP (1-36). Las CMLV fueron pretratadas con dos inhibidores diferentes de la PKA, RpcAMPS (2.5 - 5×10^{-5} mol/L) y H89 (10^{-7} mol/L) o con el inhibidor del NF- κ B partenolide (Parte) (10^{-5} mol/L), y posteriormente se añadió PTHrP (1-36) (10^{-8} mol/L). El pretratamiento con PTHrP (7-34) (10^{-6} mol/L) eliminó la expresión del ARNm de MCP-1 inducido por la PTHrP, pero no tuvo ningún efecto solo (10^{-8} mol/L). Los Northern blots corresponden al ARNm de MCP-1 y GADPH y se muestran los valores densitométricos de 3 experimentos independientes * $P < 0.05$ vs estímulo

El NF- κ B es un factor regulador clave en la expresión génica del MCP-1. Encontramos que el inhibidor del NF- κ B, partenolide (10^{-5} mol/L), anuló el aumento del ARNm de la MCP-1 inducido por la PTHrP (1-36) (10^{-8} mol/L) en CMLV (Figura 13). Así examinamos si la PTHrP podría tener un efecto directo en la activación del NF- κ B en CMLV, como ocurre en las células osteoblásticas. La PTHrP (1-36) (10^{-8} mol/L) fue capaz de inducir la activación del NF- κ B de una forma dependiente del tiempo (Figura 14). Este efecto fue específico dado que la preincubación con un exceso de 100 veces del oligonucleótido NF- κ B sin marcar previno dicho efecto.

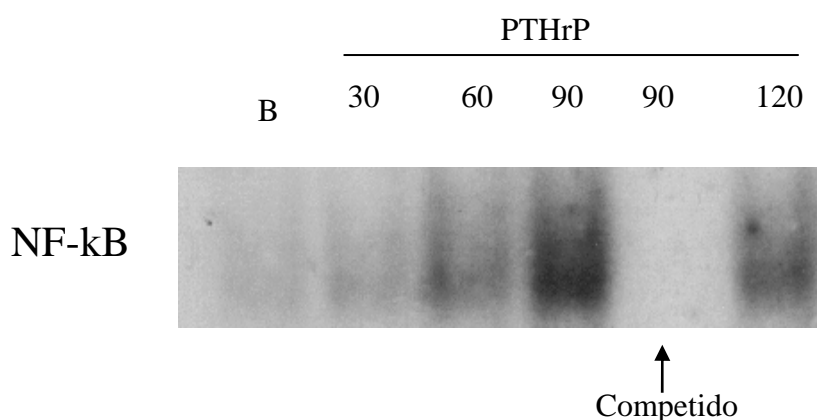


Figura 14. Efecto de la PTHrP en la activación del NF-kB en CMLV. Las CMLV estimuladas con PTHrP (1-36) (10^{-8} mol/L) para diferentes periodos de tiempo indujeron la activación del NF-kB con un efecto máximo a los 90 minutos. La preincubación con un exceso de 100 veces de oligonucleotido de NF-kB sin marcar abolió este efecto (competido).

2.3-Efecto del inhibidor de la HMG-CoA reductasa, Simvastatina, en el ARNm de MCP-1 inducido por la PTHrP (1-36)

Partiendo de que las estatinas pueden disminuir la sobreexpresión de MCP-1 y la activación del NF-kB tanto in vivo como in vitro, estudiamos si la simvastatina podría también regular a la baja el efecto de la PTHrP (1-36) en el ARNm de MCP-1 y en la activación del NF-kB en CMLV. Encontramos que el tratamiento previo con simvastatina, en rangos terapéuticos (10^{-6} a 10^{-7} mol/L) inhibió la sobreexpresión del ARNm de MCP-1 inducido por la PTHrP. Cuando las CMLV fueron tratadas con PTHrP y simvastatina en presencia de mevalonato (10^{-4} mol/L), metabolito que es directamente sintetizado por la HMG-CoA reductasa, este efecto se revirtió (Figura15A). Además, la simvastatina (10^{-6} mol/L), disminuyó la activación del NF-kB, y este efecto fue también revertido por el mevalonato (Figura 15B). Estos resultados sugieren que las estatinas podrían regular a la baja la expresión de MCP-1, al menos en parte, por interferir con el efecto de la PTHrP en CMLV.

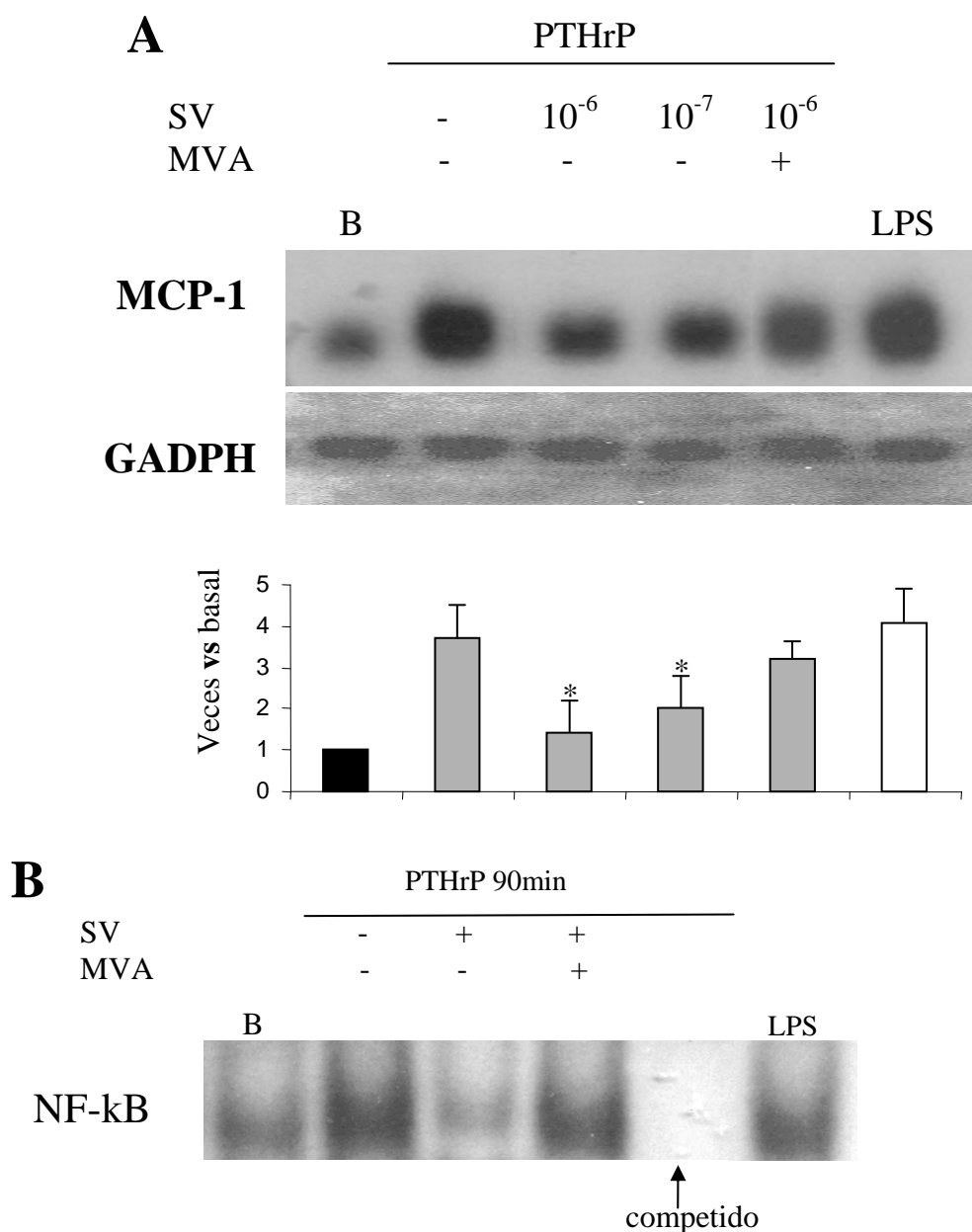


Figura 15. A. Efecto de la simvastatina en el ARNm de MCP-1 y en la activación de NF-kB en CMLV inducido por PTHrP. Las CMLV fueron incubadas con PTHrP (1-36) (10^{-8} mol/L) durante 6 horas en presencia de concentraciones decrecientes de simvastatina (10^{-6} a 10^{-7} mol/L) con o sin mevalonato (MVA) (10^{-4} mol/L). Se muestran Northern blot correspondientes a ARNm de MCP-1 y GADPH y los valores densitométricos de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs valor estímulo. LPS indica lipopolisacarido. B. El pretratamiento con simvastatina (SV) (10^{-6} mol/L) disminuyó la activación de NF-kB a los 90 minutos y este efecto se revirtió con el mevalonato (MVA) (10^{-4} mol/L). Se muestra una imagen representativa de tres ensayos de retardo independientes.

3.- ESTUDIOS EN UN MODELO DE ATEROSCLEROSIS EN CONEJO

Como habíamos visto que la PTHrP estaba presente en las placas de aterosclerosis humanas y que su efecto proinflamatorio podía ser modulado por la simvastatina, decidimos profundizar en el estudio del papel de la PTHrP, analizando sus niveles en un modelo de aterosclerosis en conejos hiperlipidémicos. Una vez que observamos que la hiperlipidemia per se es capaz de inducir el aumento de la expresión de PTHrP, hemos realizado estudios in vitro donde estudiamos su inducción por lipoproteínas de baja densidad así como la posible modulación por simvastatina.

3.1 Niveles de lípidos en plasma y análisis morfométrico de las lesiones femorales

El grupo de conejos que recibió simvastatina mostró niveles significativamente más bajos en el colesterol total (2086 ± 363 mg/dL vs. 3759 ± 852 mg/dL, $p < 0.001$), VLDL (888 ± 232 mg/dL vs. 1789 ± 453 mg/dL, $p < 0.001$) e IDL (292 ± 74 mg/dL vs. 479 ± 226 mg/dL, $p < 0.05$) que el grupo no tratado. Los conejos que tomaron simvastatina tuvieron una importante reducción, pero no significativa, en los niveles de colesterol LDL (244 ± 103 mg/dL vs. 356 ± 186 mg/dL) y de triglicéridos (152 ± 67 mg/dL vs. 260 ± 195 mg/dL). Los niveles de HDL fueron similares entre el grupo tratado con simvastatina y el no tratado (40 ± 8 mg/dL and 43 ± 12 mg/dL, respectivamente). Es importante destacar que en los conejos la mayoría de fracciones lipídicas aterogénicas están asociadas al VLDL (Figura 16).

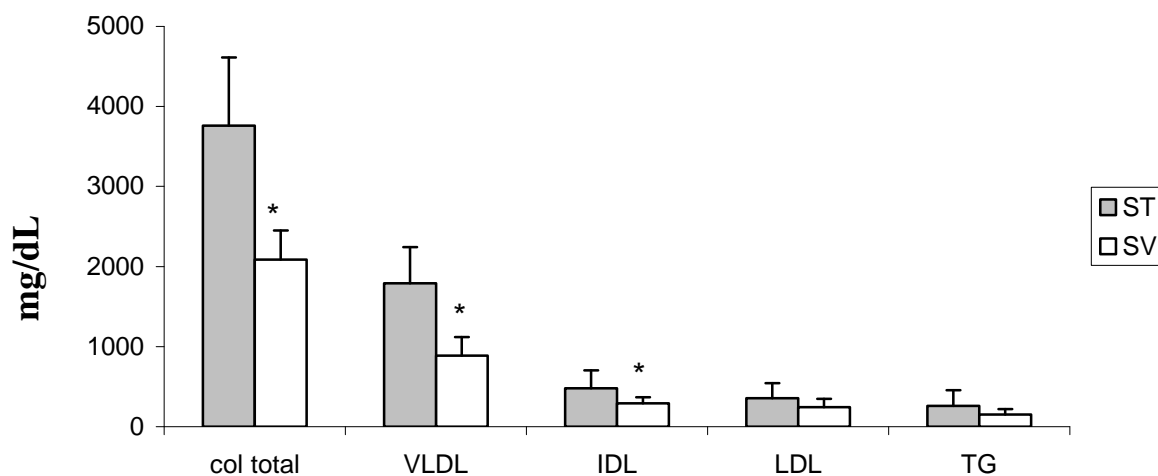
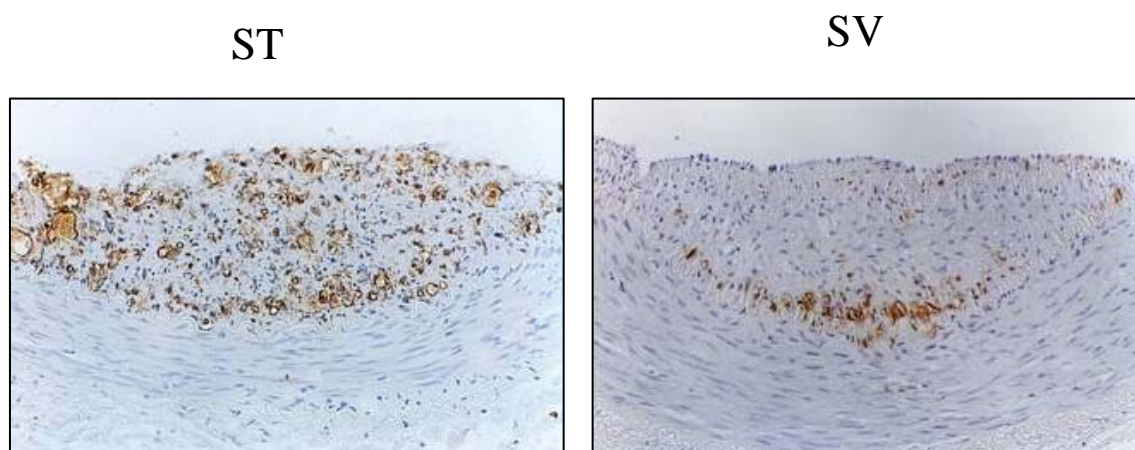


Figura 16: Niveles lipídicos en plasma de los conejos con y sin tratamiento con simvastatina. Muestran una reducción estadísticamente significativa en los niveles de colesterol total, VLDL e IDL y no significativa para LDL y triglicéridos en los conejos tratados. $*p < 0,05$

Además el área de estenosis máxima se redujo en el grupo tratado con simvastatina, comparado con el no tratado ($55 \pm 18\%$ vs. $71 \pm 34\%$, $p < 0.01$). El grupo de simvastatina mostró una reducción en el porcentaje de infiltración de macrófagos en la neoíntima femoral respecto a animales no tratados ($5 \pm 2\%$ vs. $19 \pm 12\%$; $p < 0.05$) (Figura 17)



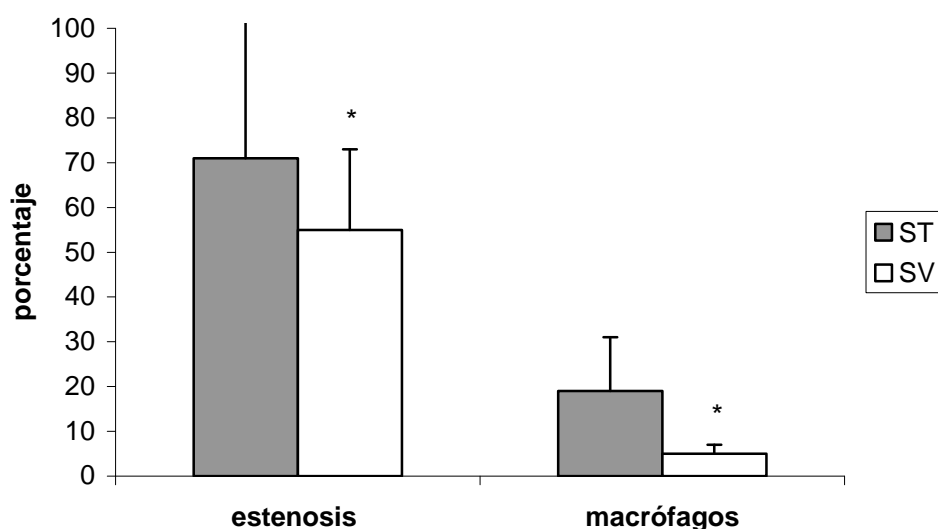


Figura 17 Infiltración de macrófagos en la pared arterial: El grupo no tratado muestra un mayor porcentaje de estenosis femoral y un mayor porcentaje de infiltración de macrófagos en la neoíntima femoral, ambos con significación estadística. * $p < 0,05$.

3.2 Inmunohistoquímica de PTHrP en la neoíntima femoral.

Los conejos sanos mostraron una tinción para la PTHrP muy débil (no mostrado), en contraste con los animales ateroscleróticos que mostraron un aumento de la tinción de PTHrP en la neoíntima femoral, la cual fue disminuyendo en los tratados con simvastatina ($38 \pm 7\%$ vs. $15 \pm 6\%$; $p < 0.05$, Figura 18A y B). Sin embargo la tinción de PTHR1 fue aumentando en los conejos no tratados en relación al grupo tratado con simvastatina, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($32 \pm 18\%$ vs. $24 \pm 16\%$, no significativo, Figura 18C y D).

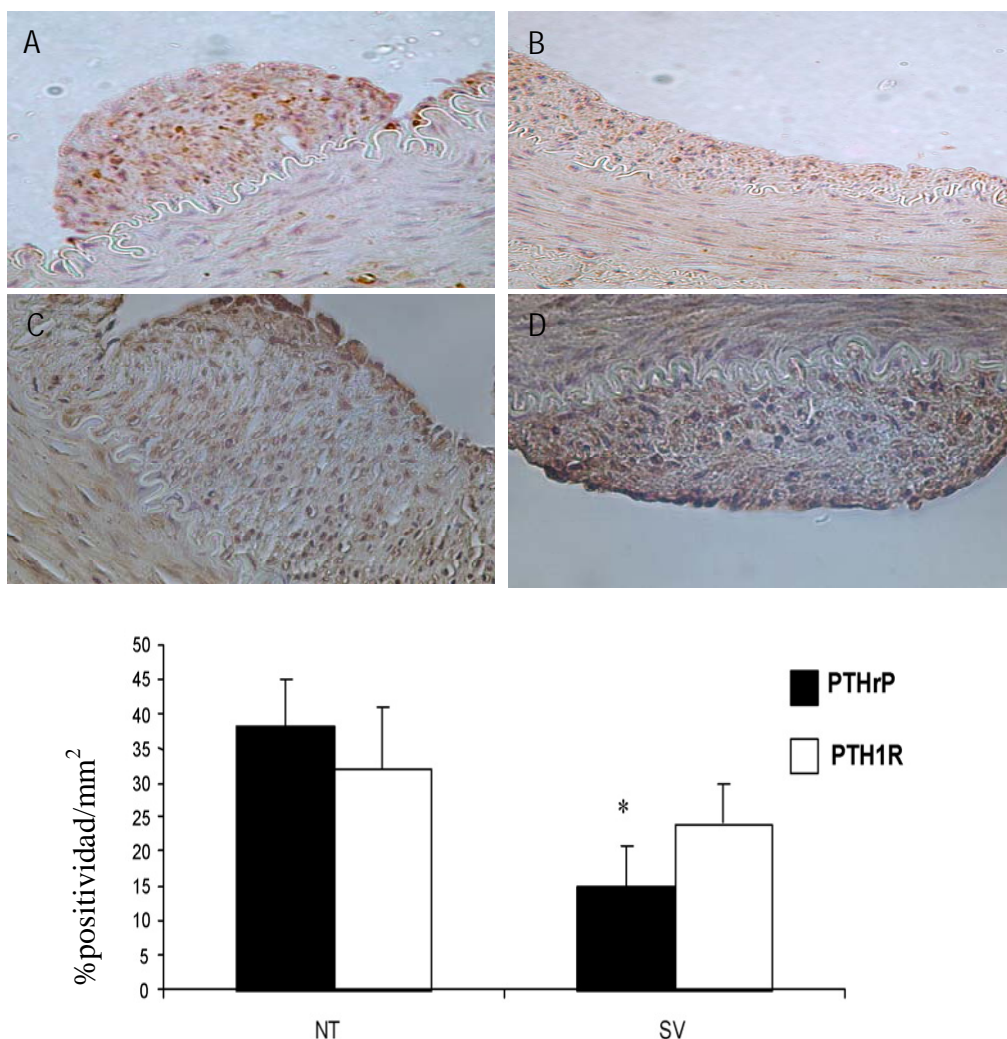


Figura 18. Inmunotinción de la PTHrP y PTH1R en secciones de arteria femoral de conejos con aterosclerosis. Secciones representativas de inmunotinciones de PTHrP (A) y PTH1R (C) en la placa de ateromatosa de un conejo hiperlipidémico no tratado. (NT). El tratamiento con simvastatina (SV) produjo una disminución significativa en la PTHrP(B) pero no en PTH1R(D). Magnificación 200x.(E) Valores correspondientes para tinción de PTHrP (negro) y PTH1R(blanco) para conejos tratados (SV, $n = 7$) o no tratados,(NT, $n = 6$). * $p < 0.05$ vs. NT.

La localización celular de los macrófagos y la PTHrP se apreciaron en la misma área de la placa, similar a nuestro estudio previo con placas humanas, pero la tinción de PTHrP está más ampliamente distribuida en este modelo experimental, especialmente asociado a las CMLV (Figura 19). Por esta razón la siguiente parte del estudio se enfocó en la potencial modulación de la PTHrP por la simvastatina realizada en cultivos de CMLV in vitro.

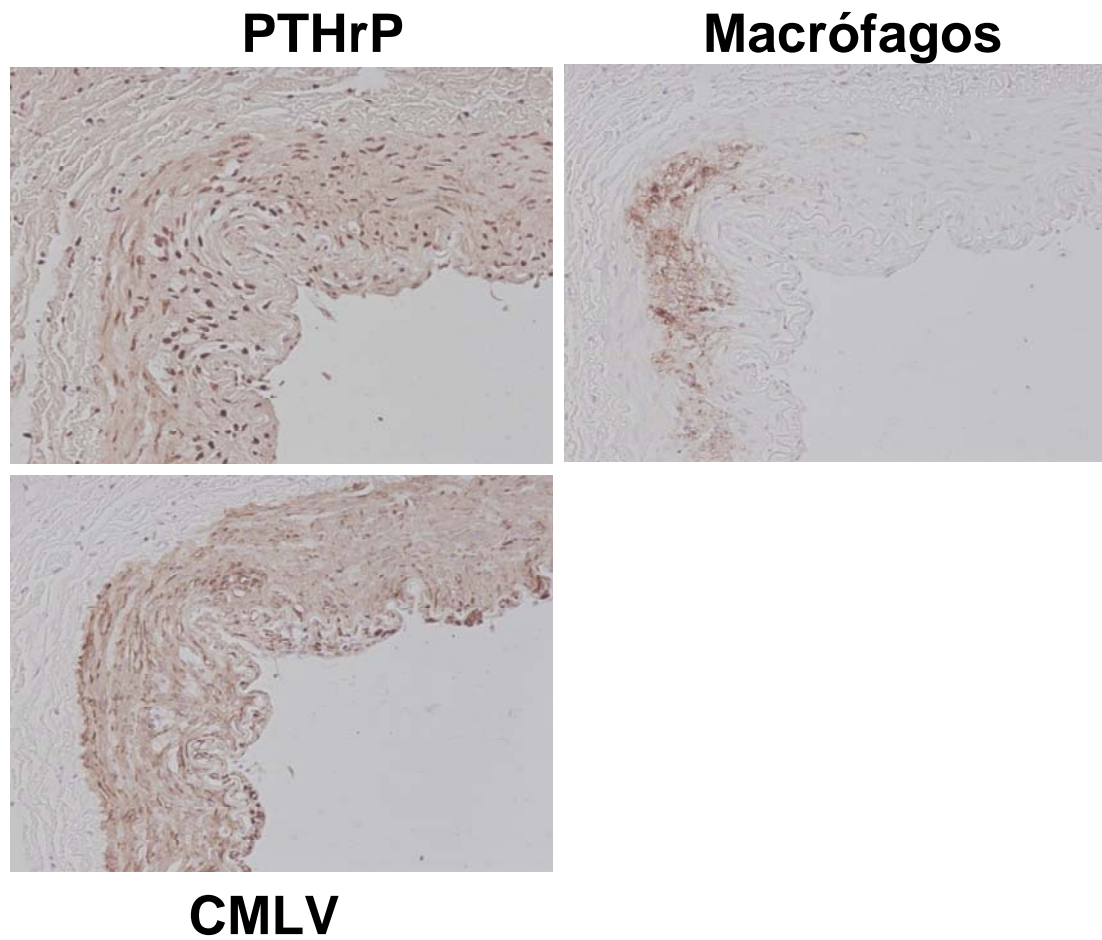


Figura 19: PTHrP, macrófagos y CMLV en secciones adyacentes de arterias ateroscleróticas de conejos. La localización de macrófagos y PTHrP se encontró en la misma área de la placa. Sin embargo la PTHrP se encontró más ampliamente distribuida y asociada principalmente a las CMLV.

4.- ESTUDIOS IN VITRO (segunda parte)

4.1 Expresión de la PTHrP en CMLV estimuladas con LDLnativas

Evaluamos el efecto de concentraciones aterogénicas de LDLn en la expresión de la PTHrP en cultivos primarios de CMLV. En CMLV encontramos que la estimulación con LDLn (0.125–0.5 mg/ml) aumentó el ARNm de la PTHrP de forma dependiente de la dosis a las 3 horas (Figura 20). Resultados similares se obtuvieron cuando se usaron esas mismas dosis de LDL disponibles comercialmente.

Asimismo, la incubación de CMLV con 0.25 mg/mL de LDLn indujo la expresión proteica de la PTHrP con un pico a las 6 horas y disminuyendo posteriormente (Figura 20).

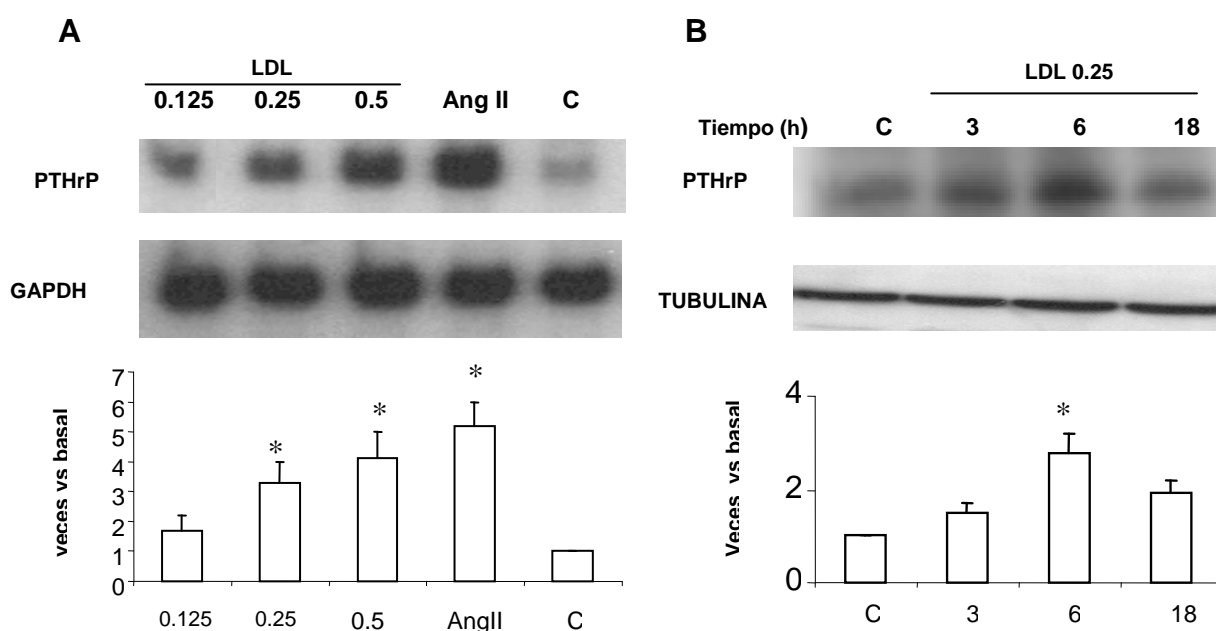


Figura 20: Efecto del LDLn en el ARNm de la PTHrP y en la expresión proteica en cultivos de CMLV. (A) Niveles de ARNm de PTHrP en CMLV incubadas con concentraciones crecientes de LDLn (0.125–0.5 mg/mL) durante 3 horas que fueron analizadas mediante Northern blot. Se usó la Ang II como control positivo. (B) Los niveles de PTHrP en CMLV tratados con LDLn (0.25 mg/mL) durante diferentes periodos (3–18 h) fueron determinados por Western blot. Los niveles de ARNm de la GAPDH (A) y los niveles de tubulina (B) fueron también analizados como controles. C= células control no estimuladas. * $p < 0.05$ vs. C.

4.2.-La simvastatina disminuye la expresión de la PTHrP inducida por la LDLn en CMLV y es revertido por mevalonato y GGPP

Para determinar si la disminución de la PTHrP en las placas ateroscleróticas en animales tratados con simvastatina se debe, al menos en parte, al efecto directo de las estatinas, realizamos un experimento in vitro en CMLV. Vimos que la simvastatina en rango terapéutico ($1\mu\text{mol/L}$), previno la sobreexpresión de la PTHrP inducida por la LDLn (Figura 21A).

Ya que el mevalonato es directamente sintetizado por la HMG-CoA reductasa, estudiamos si este metabolito podría contrarrestar el efecto inhibitorio de la simvastatina en la sobreexpresión de la PTHrP inducida por las LDLn en CMLV. Así, estas células se preincubaron con simvastatina, y entonces se incubaron con LDLn en presencia o ausencia de $100\mu\text{mol/L}$ de mevalonato. Se observó que este metabolito revierte el efecto inhibitorio de la simvastatina sobre la PTHrP (Figura 21A). Además, GGPP ($5\mu\text{mol/L}$) y en menor medida FPP ($5\mu\text{mol/L}$), dos isoprenoides en la cascada en la vía del mevalonato, también revierten el efecto inhibitorio de la simvastatina en la expresión proteica de la PTHrP inducida por LDLn (Figura 21A). Estos resultados sugieren que estos metabolitos podrían participar en el mecanismo de la regulación de la PTHrP inducida por LDLn en CMLV.

Estudios previos han demostrado que la prenilación de Ras lleva a la inducción de la PTHrP en varios tipos celulares (Guillen 2004 y Aklilu 1997), en el mismo sentido que los resultados obtenidos usando FPP. Sin embargo, dado que con la GGPP fue posible completar el efecto inhibitorio de la simvastatina en la expresión de la PTHrP, examinamos la posible involucración de las proteínas Rho como mediadores de la sobreexpresión de la PTHrP inducida por LDL en CMLV. Con este fin, analizamos el efecto del vector (N19RhoA) dominante-negativo en la sobreexpresión de la PTHrP inducida por LDLn en CMLV. Como muestra la figura 21B, la transfección celular con este vector, pero no con el plásmido completo, inhibió significativamente la inducción de la proteína PTHrP por concentraciones aterogénicas de LDLn en esas células. Además, Rho A constitutivamente activo aumentó significativamente la expresión de la PTHrP. Estos datos apoyan que Rho A está involucrada especialmente en el control de la expresión de PTHrP en CMLV.

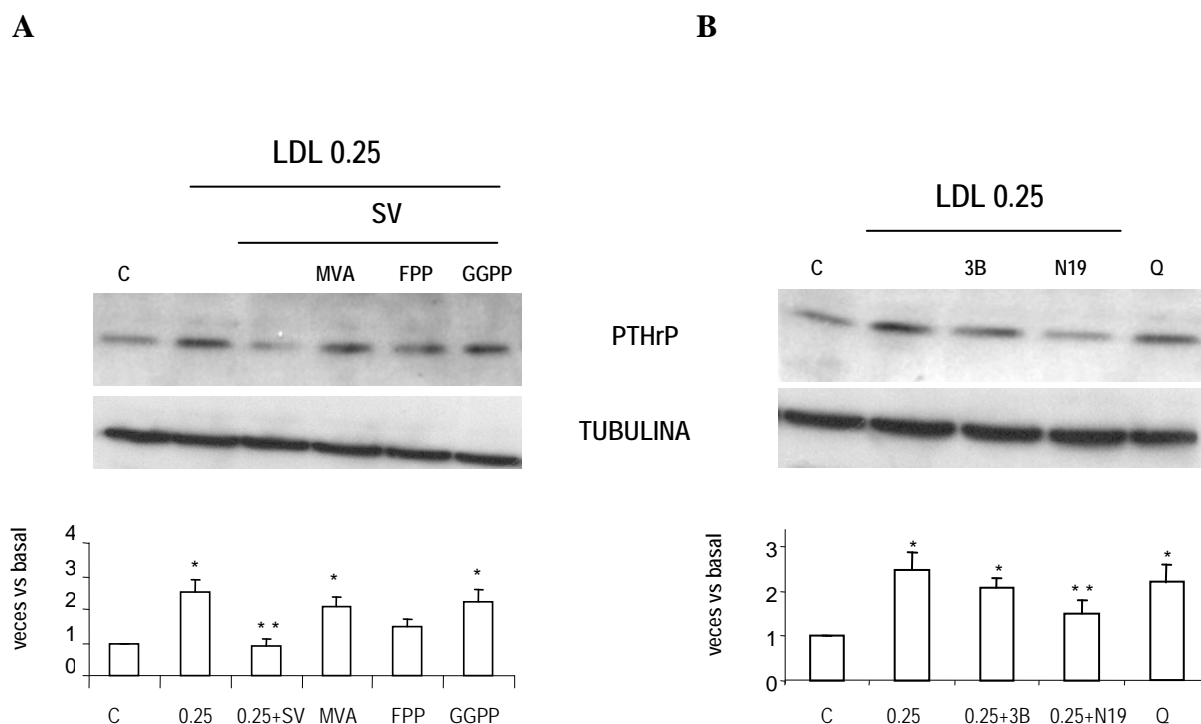


Figura 21: Efecto del mevalonato y diferentes isoprenoides en la expresión de la proteína PTHrP inducida por LDLn en las CMLV. (A) las células fueron incubadas con LDL (0.25 mg/mL) durante 6 horas en presencia o ausencia de simvastatina (SV) (1μmol/L), con o sin mevalonato (MVA) (100μmol/L), FPP (5μmol/L), o GGPP (5μmol/L). (B) Las células fueron transfectadas con un vector dominante-negativo RhoA (N19 RhoA), vector vacío (pcDNA 3B) o uno constitutivamente activo RhoA (Q), antes de la estimulación con LDLn (0.25 mg/mL) durante 6 horas. Los niveles de PTHrP fueron valorados mediante Western blot. La tubulina se usó como control C= células control no estimuladas. * $p < 0.05$ vs. C; ** $p < 0.05$ vs. valor estímulo.

4.3.- Silenciando la PTHrP se modula la proliferación de CMLV humanas

Para valorar el papel fisiopatológico de la PTHrP en la modulación de la aterosclerosis, analizamos el efecto del silenciamiento de la PTHrP en cultivos de CMLV humanas. Primero comprobamos que el cultivo a las 3 horas con 0.25 mg/mL de LDLn inducía la expresión de ARNm de PTHrP en CMLV humanas. Además la tranfección con ARNsi de PTHrP humana abolió el efecto estimulante de la LDLn en la expresión de ARNm de la PTHrP (Fig. 22A). En esas condiciones encontramos que los niveles aterogénicos de LDLn indujeron el crecimiento de CMLV y este efecto mitógeno se bloqueó silenciando la PTHrP (Figura 22B).

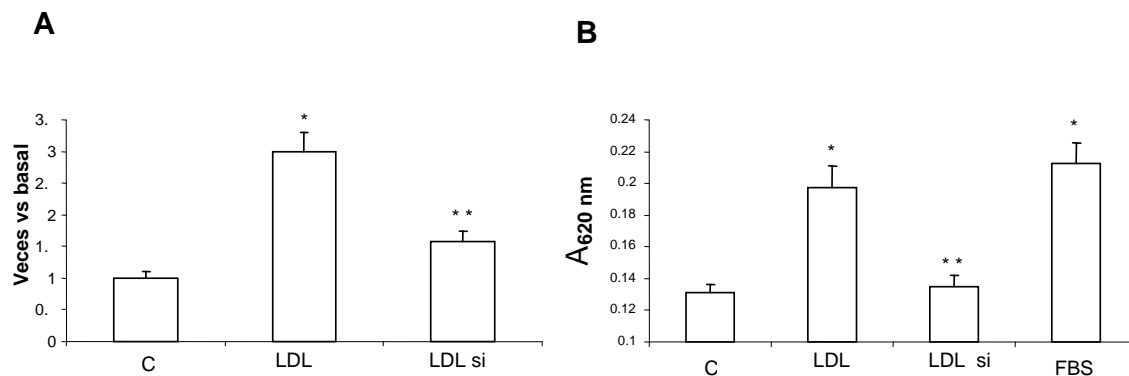


Figura 22: Efectos del silenciamiento de la PTHrP sobre el proliferación de las CMLV. La expresión del ARNm de la PTHrP (A) y la proliferación celular (B) en células tranfectadas o no con PTHrP ARNsi durante 24 horas antes de la estimulación con LDLn o 10% FBS [o nada, control (C)] durante otras 24 horas. * $p < 0.05$ vs. C; ** $p < 0.05$ vs. estímulo.

V- DISCUSIÓN

Después del tratamiento inicial de una lesión coronaria mediante angioplastia, el riesgo de un nuevo cuadro coronario agudo es del 10% el primer año y del 5% anual en los siguientes 4 años. En el caso de un infarto cerebral por una lesión carotídea la posibilidad de un nuevo accidente isquémico si no tratamos quirúrgicamente la estenosis es del 26% a dos años. En prevención primaria el esfuerzo se ha enfocado en encontrar marcadores plasmáticos y test no invasivos que identifiquen esas placas vulnerables capaces de producir nuevos episodios.

Aunque aún no hay estudios prospectivos, existen estudios retrospectivos de autopsias que sugieren que hay varios tipos histológicos de placas vulnerables, la más común es aquella con ateroma con una fina e inflamada cápsula, la cual se encuentra en el 60-70% de los síndromes coronarios agudos y el resto en placas con lugares de erosión ricos en proteoglicanos (Wasman, 2006).

El 30% de los infartos se producen sin rotura de placa por la formación del trombo sobre una placa con poco contenido graso y que estenosa mucho la luz del vaso (Fuster, 2000). De esta forma no sólo tenemos que fijarnos en la posible placa vulnerable, sino que la sangre puede jugar un papel fundamental. En los últimos años, ha cobrado un mayor interés la búsqueda de marcadores inflamatorios en suero como la proteína C reactiva que está asociada con el fenómeno de inestabilidad que conduce al evento isquémico (Álvarez García, 2003) y en la patogenia del síndrome coronario agudo a través de su vía pro-oxidativa (Kobayashi, 2003). Otros autores han descrito que la actividad del NF- κ B está incrementada en pacientes con angina inestable (Ritchie, 1998). Nuestro grupo recientemente ha demostrado que hay un aumento de la activación de NF- κ B en las células mononucleares de pacientes con aterosclerosis carotídea en relación a controles sanos (Martín-Ventura, 2004).

La inflamación juega un papel fundamental en el desarrollo y rotura de la placa aterosclerótica. Este proceso de rotura se ha demostrado que ocurre con mayor frecuencia en la zona de los hombros, un área caracterizada por un elevado contenido inflamatorio [Jeziorska, 1999]. Los macrófagos expresan metaloproteasas que degradan la matriz extracelular provocando el debilitamiento de la cápsula fibrosa, demostrándose una mayor presencia de estas enzimas en esta zona vulnerable (Johnson, 1998). Por otro lado, en esta región se ha localizado la presencia de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y proteínas procoagulantes (TF). En la zona de los hombros de la placa aterosclerótica de pacientes con estenosis carotídea hemos observado que hay un mayor contenido de células inflamatorias (macrófagos y linfocitos T) con

respecto a la otra zona estudiada, la cápsula. En ella, las células mayoritarias son las CMLV, que son capaces de sintetizar colágeno y otras proteínas de matriz extracelular que confieren resistencia a la cápsula fibrosa

En los últimos años la PTHrP ha ganado interés por sus acciones pleiotrópicas en el sistema cardiovascular (Clemens., 2001, Ross., 2005, Fiaschi-Taesch., 2006). El gen de la PTHrP está sobreexpresado en los vasos de ratas y humanos durante la formación neointimal y la intensidad de la tinción para la PTHrP en CMLV ha sido correlacionada con la severidad de la aterosclerosis coronaria (Nakayama 1994 y Ozeki 1996). Sin embargo el mecanismo responsable de esta sobreexpresión permanece indefinido. Estos hallazgos conllevan la posibilidad de que la PTHrP pueda contribuir en la patogénesis de la aterosclerosis y la reestenosis.

La región N-terminal de la PTHrP inhibe la migración y proliferación de las CMLV en lesiones ateroscleróticas in vivo e in vitro (Ishikawa 1998 e Ishikawa 2000). De acuerdo con esto en el presente estudio mostramos que la tinción para la PTHrP aumentó en el área más vulnerable de la placa humana, conteniendo un menor número de CMLV.

Estudios previos sugirieron ver a la PTHrP como un miembro de las citoquinas involucrado en la respuesta inflamatoria en las enfermedades cerebrales y reumáticas (Funk., 1998, Funk 2001). La inflamación está involucrada en la génesis, ruptura y trombosis de las placas ateroscleróticas. La ruptura de la placa ocurre más frecuentemente en puntos donde la capa fibrosa es más fina y donde hay un gran número de células inflamatorias como macrófagos y linfocitos T (Van der Wal, 1994). Una posible explicación fue el aumento de la collagenosis mediada por las metaloproteasas, cuya expresión fue ampliamente confirmada en la región de los hombros de la placa (Sukhova, 1999). En contraste, los mecanismos por los cuales los macrófagos se acumulan en esta región no han sido totalmente definidos. En el presente trabajo observamos que la PTHrP, PTHR1 y MCP-1 estaban sobreexpresados en la región inflamatoria de las placas de carótida humana. Además la tinción para PTHrP y MCP-1 se localizó en esas mismas células en esas placas. También se vio que la PTHrP (1-36) induce la expresión de MCP-1 en cultivos de CMLV. Todos estos hallazgos sugieren que la PTHrP tiene un papel en el proceso inflamatorio involucrado en la aterosclerosis.

El fragmento N-terminal de la PTHrP ejerce sus acciones en CMLV aumentando la producción del AMPc (Nutt, 1990). Nosotros hemos demostrado en el presente estudio que los

inhibidores de la PKA bloquean el efecto de la PTHrP (1-36) en la sobreexpresión del MCP-1 en CMLV y que la preincubación con la PTHrP (7-34), el cual no induce la actividad del AMPc, abolió este efecto. En este sentido, el aumento en la expresión del MCP-1 inducido por la leptina se ha visto previamente que depende de la activación de la PKA .

Adicionalmente, nuestros datos indican que el NF- κ B también parece estar implicado en el efecto de la PTHrP sobre la expresión del MCP-1 en estas células, ya que el partenolide, que específicamente inhibe la activación del NF- κ B al prevenir la degradación de su subunidad inhibidora, abolió dicho efecto. Además, también hemos comprobado que la PTHrP (1-36) es capaz de inducir la activación del NF- κ B en CMLV. En este sentido, nosotros habíamos descrito previamente que la región de los hombros de placas ateroscleróticas humanas está caracterizada por una elevada activación del NF- κ B (Martín-Ventura 2001) y como hemos visto aquí por una elevada expresión de la PTHrP. Estos datos sugieren un nuevo mecanismo por el cual la PTHrP puede ejercer sus efectos en CMLV. Tanto la PKA como el NF- κ B parecen estar implicados en los mecanismos de señalización implicados en la sobreexpresión del MCP-1 inducida por la PTHrP (1-36). En este sentido, hemos publicado recientemente que este péptido induce la activación del NF- κ B en células osteoblásticas por un mecanismo dependiente de AMPc (Guillen, 2000).

Analizando los datos encontrados por nuestro grupo y por otros (Ozeki, 1996) en placas ateroscleróticas y reestenóticas humanas, en los cuales se observa una clara implicación de la PTHrP en el proceso inflamatorio y proliferativo de la aterosclerosis humana, decidimos profundizar en el estudio del papel de la PTHrP, analizando sus niveles en un modelo de aterosclerosis en conejos hiperlipidémicos.

Usando este modelo experimental de aterosclerosis en conejos, hemos explorado la relación entre hiperlipidemia (niveles altos de LDL) y la sobreexpresión de la PTHrP en estas condiciones. Encontramos un aumento de la tinción de PTHrP en placas de arterias femorales de los conejos hiperlipidémicos comparada con la observada en conejos sanos. Además nuestros estudios in vitro mostraron que la LDLn, dosis dependiente, inducía la expresión de la PTHrP en cultivos de CMLV.

Mientras que la PTHrP inhibe la proliferación de CMLV a través de la vía autocrina y/o paracrina, en marcado contraste la PTHrP (1-141) tranfectada en CMLV A10 de rata, vía intracrina, induce un marcado crecimiento celular (Massfelder 1997). La PTHrP en estado basal

está presente a niveles bajos en la pared arterial y aumenta rápidamente en respuesta a la angioplastia y otros tipos de lesión arterial. El mecanismo responsable de estos efectos proliferativos involucra la entrada de la PTHrP en el núcleo. Interesantemente un reciente estudio ha mostrado que estos efectos opuestos de la PTHrP en la proliferación de las CMLV son revertidos espontáneamente en ratas hipertensas (Ni., 2001).

La relevancia fisiopatológica de la sobreexpresión de la PTHrP en la aterosclerosis podría ser debida a dos importantes mecanismos relacionados con la aterosclerosis, como la proliferación y la inflamación. La LDL ha mostrado tener un efecto mitógeno en las CMLV por mecanismos poco entendidos, el cual se puede deber a un aumento de la expresión de algunos factores de crecimiento (Scheidegger, 2000; Stiko-Rahm, 1992). De esta forma se sugiere un papel modulador de la PTHrP en los efectos mitógenos de la LDL en las arterias ateroscleróticas por la relación observada entre el tamaño de la lesión y la tinción para PTHrP en nuestro modelo de conejos. Sin embargo esta parte es actualmente controvertida. Una publicación ha dilucidado el mecanismo responsable para estos efectos, el cual requiere la interacción de la PTHrP con algunas proteínas componentes del ciclo celular, principalmente del complejo CyclinE/cdk2/p27 (Fiaschi-Taesch, 2006)

Nuestros estudios in vitro apoyan las observaciones in vivo mencionadas y sugieren que la señal mitogénica dependiente de la PTHrP contribuye a la progresión del ateroma. Para valorar el papel fisiopatológico de la PTHrP en la modulación de la aterosclerosis, analizamos el efecto del silenciamiento de la PTHrP en cultivos de CMLV humanas. Primero comprobamos que el cultivo con LDLn inducía la expresión de ARNm de PTHrP en CMLV humanas. Además la transfección con ARNsi de PTHrP humana abolió el efecto estimulante de la LDLn en la expresión de ARNm de la PTHrP. En esas condiciones encontramos que los niveles aterogénicos de LDLn indujeron la proliferación de CMLV y este efecto mitógeno se bloqueó silenciando la PTHrP.

El papel de la inflamación ha sido también ampliamente descrito. La acumulación de lípidos en la pared arterial activa un complejo proceso inflamatorio orquestado por varios mediadores del sistema inmune (Glass, 2001; Ross, 1999). Encontramos que las placas ateroscleróticas de los conejos hiperlipidémicos tienen una infiltración de macrófagos aumentada asociada con una alta tinción para PTHrP. Esto apoya los resultados en placas carótideas humanas mostrando una relación entre el aumento de la PTHrP y la MCP-1 en las regiones inflamatorias de las placas ateroscleróticas. También en otros trabajos se ha

demostrado que la LDLn induce citoquinas proinflamatorias como interleukinas (IL-8) en CMLV in vitro (Ryoo, 2004) y factor de necrosis tumoral (TNF- α) in vivo e in vitro (Niemann-Jonsson, 2000). Previamente encontramos que la PTHrP tiene un importante papel en los procesos de inflamación de una gran variedad de sucesos patológicos (Rámila, 2008; Funk, 2001). Los presentes resultados sugieren otro mecanismo potencial, involucrando a la PTHrP, por el que la hiperlipidemia podría contribuir a la respuesta inflamatoria en la aterosclerosis.

Se ha comprobado con estudios clínicos randomizados que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa disminuyen la incidencia de eventos coronarios agudos, sugiriendo que aumentan la estabilidad de la placa y que reducen la incidencia de trombosis (The 4S investigators, 1995). En este sentido, caben destacar los estudios prospectivos randomizados para observar el efecto de las estatinas sobre uno de los principales biomarcadores estudiados en relación con la inflamación de la enfermedad aterosclerótica como la Proteína C reactiva de alta sensibilidad. En el estudio CARE (Ridker, 1999) en el que se realizaron dos grupos uno en tratamiento con placebo y otro con pravastatina se observó una disminución de la Proteína C reactiva de alta sensibilidad del 17% en el grupo de las estatinas y un aumento del 4% en el placebo, esta reducción fue estadísticamente significativa y además se apreció un aumento del número de episodios coronarios agudos estadísticamente significativo en el grupo placebo. Otro estudio similar con 2884 pacientes tratados durante 24 semanas con pravastatina en el que se logró una disminución de la Proteína C reactiva de alta sensibilidad en el grupo tratado con la estatina (Albert, 2001). En un estudio randomizado prospectivo en pacientes con hipercolesterolemia familiar tratados aleatoriamente con simvastatina 40mg o atorvastatina 80mg durante 2 años se logró una disminución de la Proteína C reactiva de alta sensibilidad a casi la mitad en ambos grupos y siendo efectiva en el 71% de los pacientes con atorvastatina y en el 59% con simvastatina.

En un metanálisis realizado sobre 14 estudios prospectivos randomizados con datos de 90056 pacientes (Cholesterol Treatment Trialists (CTT) Collaborators, 2005) se comprobó que el tratamiento con estatinas producía una disminución de los cuadros isquémicos coronarios, la necesidad de revascularización, los infartos cerebrales isquémicos y las trombosis agudas en patología arterial periférica, reduciendo así la mortalidad global.

Algunos ensayos clínicos han demostrado que los pacientes que van a ser tratados con una cirugía mayor, en los cuales el 65% de la mortalidad se debe a complicaciones

cardiovasculares, si son tratados previamente con estatinas disminuye la mortalidad global del 25% al 8% lo cual significa una reducción del riesgo de 4 veces y con significación estadística.

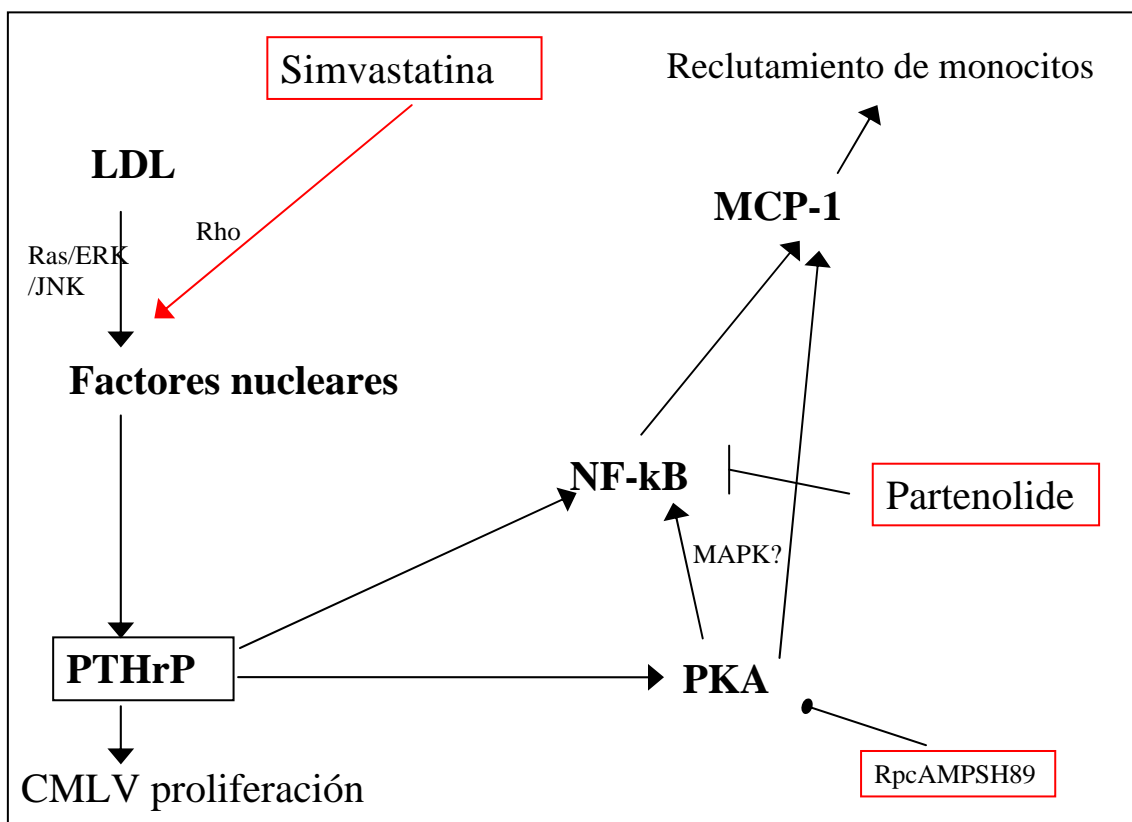
Aunque algunos estudios en animales de experimentación han sugerido que existe una estabilización de las placas ateroscleróticas mediante la disminución de los niveles lipídicos, los mecanismos por los que esto ocurre no están todavía perfectamente aclarados. Además, se ha demostrado que estas drogas disminuyen el grado de aterosclerosis en modelos experimentales sin hiperlipidemia y en ausencia de reducción lipídica (Sparrow 2001). En un modelo de aterosclerosis en conejos nosotros hemos comprobado previamente que el tratamiento con atorvastatina disminuyó la activación del NF- κ B tanto en la neointima como en la media de arterias femorales, coincidiendo con una disminución del MCP-1, del contenido de macrófagos y del tamaño de la lesión (Bustos., 1998)

En este modelo encontramos que la simvastatina disminuye la expresión de la PTHrP junto con la infiltración de macrófagos y disminuyó la sobreexpresión de la PTHrP con dosis aterogénicas de LDLn en CMLV in vitro. Además, previamente habíamos visto que en CMLV en cultivo y en células mononucleares el tratamiento con atorvastatina inhibió la activación del NF- κ B y la expresión del ARNm de MCP-1 inducido por el TNF α y la angiotensina II (Ortego, 1999). De forma similar hemos demostrado aquí que la simvastatina previno el efecto de la PTHrP (1-36) en la sobreexpresión del ARNm de MCP-1 en CMLV en cultivo por un mecanismo dependiente de la activación de NF- κ B. Por lo tanto, nosotros sugerimos que las estatinas pueden disminuir la expresión del MCP-1, al menos en parte, interfiriendo con los efectos de la PTHrP en estas células, lo cual sería un nuevo mecanismo potencial por el cual las estatinas podrían ejercer sus propiedades antiinflamatorias y contribuir a la estabilización de la placa.

Las estatinas inhiben la síntesis de varios componentes de la vía del colesterol , incluyendo isoprenoides como el FPP y el GGPP los cuales están involucrados en la modificación postransduccional de pequeñas proteínas G (proteínas Ros, Ros-like, RAC y Rho entre otras)(Takai, ,2001). En el presente estudio el mevalonato revirtió el efecto inhibitorio de las estatinas en la expresión de la PTHrP en CMLV inducido por LDLn, sugiriendo que la cascada de isoprenoides podría ser responsable de la sobreexpresión de la PTHrP. Estudios previos en otros tipos celulares han mostrado que la expresión de la PTHrP puede ser inducida por Ros farnesilada (Guillén, 2004; Aklilu, 1997). Sin embargo nosotros mostramos que la FPP fue menos eficiente que la GGPP en el efecto inhibitorio de la simvastatina en la

sobrerregulación de la PTHrP en CMLV inducida por la LDLn. Por otra parte nuestros datos usando un vector dominante negativo previniendo la activación de la proteína Rho mostró que es un factor involucrado en el efecto de la simvastatina. Consistentemente con esto hemos mostrado previamente que RhoA puede mediar algunos de los efectos de las estatinas en estas células (Blanco-Colio, 2003; Ortego, 1999; Muñoz, 2006). Los actuales resultados indican que la reducción de la PTHrP debida a la simvastatina se debe claramente a la inhibición de RhoA, aunque los mecanismos por los cuales esta proteína puede regular la expresión de la PTHrP permanecen aun sin definir. En cambio, nuestros hallazgos no pueden desechar que otras proteínas ligadas a la GTP puedan también regular la expresión de la PTHrP en las CMLV. Además, como la simvastatina redujo la concentración de lípidos en nuestros conejos, nuestro estudio no permite asegurar si la disminución del nivel de lípidos podría también contribuir a la regulación a la baja de la PTHrP inducida por la simvastatina in vivo.

En conclusión, la PTHrP está sobreexpresada en las placas ateroscleróticas y en CMLV en respuesta a dosis aterogénicas de LDLn. También se vio que la PTHrP puede jugar un papel importante en el reclutamiento de monocitos/macrófagos a la lesión mediante la inducción de la expresión de MCP-1 en cultivos de CMLV. Todos estos hallazgos sugieren que la PTHrP tiene un papel en el proceso inflamatorio-proliferativo involucrado en la aterosclerosis. Además demostramos que la simvastatina puede modular su sobreexpresión y sus efectos proaterogénicos, lo cual soporta el efecto beneficioso de las estatinas en la aterosclerosis.



VI- CONCLUSIONES

- La PTHrP se encuentra preferentemente en la región de los hombros en las placas ateroscleróticas carotídeas humanas donde existe una mayor actividad inflamatoria lo cual sugiere que esta proteína se encuentra implicada en la inestabilidad de las placas ateroscleróticas humanas.
- El papel de la PTHrP en el reclutamiento de monocitos que ocurre en la aterosclerosis se debe, al menos en parte, al aumento del ARNm y de la proteína MCP-1 tras incubar las CMLV con PTHrP.
- La PTHrP induce la activación del NF- κ B, lo cual parece ser el mecanismo por el que la PTHrP desarrolla el efecto inflamatorio en la aterosclerosis
- Los niveles de colesterol son capaces per se de aumentar la expresión de PTHrP en un modelo experimental de aterosclerosis y el tratamiento con estatinas disminuye la sobreexpresión de la PTHrP tanto in vivo como in vitro.
- La simvastatina disminuye la sobreexpresión de moléculas inflamatorias como el MCP-1 y también la activación del NF- κ B inducidas por la PTHrP y podría interferir en el efecto proinflamatorio y proliferativo de la PTHrP en las CMLV.

VII- BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Aklilu F, Park M, Goltzman D, Rabbani SA. Induction of parathyroid hormone-related protein by the Ras oncogene: role of Ras farnesylation inhibitors as potential therapeutic agents for hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res* 1997;57:4517–22.
- ✓ Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the Pravastatin Inflammation/ CRP Evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *J Am Med Assoc* 2001;286:64_70.
- ✓ Álvarez García B, Ruiz C, Chacón P, Sabin JA, Matas M. High-sensitivity C-reactive protein in high-grade carotid stenosis: risk marker for unstable carotid plaque. *J Vasc Surg* 2003;38:1018-24.
- ✓ Barnes BJ, Karin M. Nuclear factor- κ B. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Eng J Med* 1997; 336:1066-71.
- ✓ Blanco-Colio LM, Valderrama M, Alvarez-Sala LA, Bustos C, Ortego M, Hernández-Presa MA, Cancelas P, Gómez-Gerique J, Millán J, Egido J. Red wine intake prevents nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation*. 2000 Aug 29;102(9):1020-6.
- ✓ Blanco-Colio LM, Tuñón J, Martín-Ventura JL, Egido J. Antiinflammatory and immunomodulatory effects of statins. *Kidney Int* 2003;63:12–23.
- ✓ Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Klötting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Häring HU, Schleicher E, Nawroth PP. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes*. 2001 Dec;50(12):2792-808.

- ✓ Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996;97:1715-22

- ✓ Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M, Gerling A, Kaltschmidt C, Neumann FJ, Mackman N, Baeuerle PA, Walli AK, Neumeier D. Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Oct;17(10):1901-9

- ✓ Brown BG, Zhao X-Q, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression. New insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* 1993; 87: 1781-91

- ✓ Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Díaz C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:2057–2064.

- ✓ Chatterjee S. Role of oxidized human plasma low density lipoproteins in atherosclerotic: effects on smooth muscle cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 1992; 111:143-147.

- ✓ Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators* Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005; 366: 1267–78

- ✓ Clemens TL, Cormier S, Eichinger A, et al. Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br J Pharmacol* 2001;134:1113–36.
- ✓ Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques. *Circulation* 2001;103:926–933.
- ✓ Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5134–8.
- ✓ Dangas G, Badimon JJ, Smith DA, Unger AH, Levine D, Shao JH, Meraj P, Fier C, Fallon JT, Ambrose JA. Pravastatin therapy in hyperlipidemia: effects on thrombus formation and the systemic hemostatic profile. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1294–1304.
- ✓ De Miguel F, Fiaschi-Taesch N, Lopez-Talavera JC, et al. The C-terminal region of PTHrP, in addition to the nuclear localization signal, is essential for the intracrine stimulation of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2001;142:4096–4105.
- ✓ De Miguel F, Martínez-Fernández P, Guillén C, Valín A, Rodrigo A, Martínez ME, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107–139) stimulates interleukin-6 expression in human osteoblastic cells. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:796–803

- ✓ Dichtl W, Nilsson L, Goncalves I, Ares MP, Banfi C, Calara F, Hamsten A, Eriksson P, Nilsson J. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells. *Circ Res.* 1999 May 14;84(9):1085-94.

- ✓ Don Poldermans, Jeroen J. Bax, Miklos D. Kertai, Boudewijn Krenning, Cynthia M. Westerhout, Arend F.L. Schinkel, Ian R. Thomson, Peter J. Lansberg, Lee A. Fleisher, Jan Klein, Hero van Urk, Jos R.T.C. Roelandt and Eric Boersma. Statins Are Associated With a Reduced Incidence of Perioperative Mortality in Patients Undergoing Major Noncardiac Vascular Surgery. *Circulation* 2003;107;1848-1851

- ✓ Fiaschi-Taesch N, Endlich N, Massfelder T, et al. Renovascular parathyroid hormone-related protein in spontaneously hypertensive rats: dilator or trophic factor? *Kidney Int* 1998; 67:S207–S210.

- ✓ Fiaschi-Taesch N, Sicari BM, Ubriani K, Bigatel T, Takane KK Cozar-Castellano I, Bisello A, Law B, Stewart AF. Cellular Mechanism Through Which Parathyroid Hormone–Related Protein Induces Proliferation in Arterial Smooth Muscle Cells: Definition of an Arterial Smooth Muscle PTHrP/p27kip1 Pathway. *Circ. Res.* 2006;99;933-942

- ✓ Funk JL. A role for parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of inflammatory/autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1101–21.

- ✓ Funk JL, Cordaro LA, Wei H, Benjamin JB, Yocum DE. Synovium as a source of increased amino-terminal parathyroid hormone-related protein expression in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1998;101:1362–1371

- ✓ Funk JL, Trout CR, Wei H, Stafford G, Reichlin S. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) induction in reactive astrocytes following brain injury: a possible mediator of CNS inflammation. *Brain Res.* 2001; 12;915:195–209

- ✓ Fuster V. Thrombus remodeling. Key factor in the progression of coronary atherosclerosis. *Rev Esp Cardiol* 2000;53:2-7.

- ✓ Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001;104:503–16.

- ✓ Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 1999;103: 773-778.

- ✓ Guillén C, de Gortázar AR, Esbrit P. The interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor system induces parathyroid hormone-related protein in human osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 2004;75:153–9.

- ✓ Guillen C, Valín A, Esbrit P. Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein, increase interleukin-6 through nuclear factor-kappa B activation in rat osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 2000; 66 (Suppl 1): S91

- ✓ Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, Cybulsky MI. The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 1;97(16):9052-7.

- ✓ Hernández-Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Egido J. ACE inhibitor quinapril reduces the arterial expression of NF-kappaB-dependent proinflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am J Pathol*. 1998 Dec;153(6):1825-37.
- ✓ Horiuchi T, Yoshida T, Koshihara Y, Sakamoto H, Kanai H, Yamamoto S, Ito H. The increase of parathyroid hormone-related protein and cytokine levels in synovial fluid of elderly rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Endocr J* 1999;46:643-649
- ✓ Ishikawa M, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Orimo H, Ouchi Y. Amino-terminal fragment (1–34) of parathyroid hormone-related protein inhibits migration and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1998;136:59–66.
- ✓ Ishikawa M, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Orimo H, Ouchi Y. Expression of parathyroid hormone-related protein in human and experimental atherosclerotic lesions: functional role in arterial intimal thickening. *Atherosclerosis*. 2000;152:97–105.
- ✓ Jeziorska M, Woolley DE. Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *J Pathol* 1999;188: 189-96
- ✓ Johnson JL, Jackson CL, Angelini GD, George SJ. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1707-15.

- ✓ Kaartinen M, Penttilä A, Kovanen PT. Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture. *Circulation* 1994;90:1669-1678.

- ✓ Karin M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*. 1999 Nov 22;18(49):6867-74. Review.

- ✓ Kobayashi S, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M, Matsui K, Mori T, Fujita H, Awano K, Kobayashi K, Azumi H, Ejiri J, Hirata K, Kawashima S, Hayashi Y, Yokozaki H, Itoh H, Yokoyama M. Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1398-404.

- ✓ Lam MH, Thomas RJ, Martin TJ, et al. Nuclear and nucleolar localization of parathyroid hormone-related protein. *Immunol Cell Biol* 2000; 78:395–402.

- ✓ Law M.R., Wald N.J., Thompson S.G. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ* 1994; 308: 367-72

- ✓ López-Franco O, Suzuki Y, Sanjuán G, Blanco J, Hernández-Vargas P, Yo Y, Kopp J, Egido J, Gómez-Guerrero C. Nuclear factor-kappa B inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 2002 Oct;161(4):1497-505

- ✓ López-Franco O, Hernández-Vargas P, Ortiz-Muñoz G, et al. Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1864–70.
- ✓ MAAS investigators. Effect of simvastatina on coronary atheroma: the Multicentre Antiatheroma Study (MASS). *Lancet* 1994; 344: 633-38
- ✓ Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Gómez-Hernández A, Arribas A, Ortega L, Tunón J, Egido J. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke* 2004;35:458-63.
- ✓ Massfelder T, Dann P, Wu TL, et al. Opposing mitogenic and antimitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13630–5.
- ✓ Massfelder T, Endlich K, Soifer N, Clement T. Immunohistologic detection of parathyroid hormone-related protein in human renal vasculature and endothelium: independent linkage of its renodilatory actions with nitric oxide and cyclic AMP. *Kidney int.* 1996; 50:1591-603
- ✓ Massfelder T, Helwig J J, Stewart AF. PTHrP as a cardiovascular regulatory peptide. *Endocrinology* . 1996; 137: 3151-53
- ✓ Massfelder T, Kroszav S, Wu T, Helwig J-J, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein regulates proliferation in vascular smooth muscle cells in a bi-directional fashion. *FASEB J.* 1997; 11:A197

- ✓ Massfelder T, Stewart AF, Endlich K, Soifer N, Judes C, Helwig JJ. Parathyroid hormone-related protein detection and interaction with NO and cyclic AMP in the renovascular system. *Kidney Int* 1996; 50:1591-1603.
- ✓ Matrisian LM, Ganser GL, Kerr LD, Pelton RW, Wood LD. Negative regulation of gene expression by TGF-beta. *Mol Reprod Dev.* 1992 Jun;32(2):111-20. Review
- ✓ Mitchinson MJ. The new face of atherosclerosis. *Br J Clin Pract* 1994;48:149-51.
- ✓ Mok LLS, Nickols GA, Thompson JC, Cooper CW. Parathyroid hormone as a smooth muscle relaxant. *Endocri.Rev.* 1989; 10:420-36
- ✓ Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984;4:357-64.
- ✓ Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes implication for plaque rupture. *Circulation* 1994; 89:36-44.
- ✓ Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Martínez E, et al. Fn14 is upregulated in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells and is expressed in human carotid atherosclerotic plaques: modulation by atorvastatin. *Stroke* 2006;37:2044-53
- ✓ Nakayama T, Ohtsuru A, Enomoto H, Namba H, Ozeki S, Shibata Y, Yokota T, Nabuyoshi M, Ito M, Sekine I, Yamashita S. Coronary atherosclerotic smooth muscle cells overexpress human parathyroid hormone-related peptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;200: 1028-1035.

- ✓ Ni W, Egashira K, Kitamoto S, Kataoka C, Koyanagi M, Inoue S, Imaizumi K, Akiyama C, Nishida K, Takeshita A. New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2001;103: 2096-2101.
- ✓ Niemann-Jonsson A, Dimayuga P, Jovinge S, et al. Accumulation of LDL in rat arteries is associated with activation of tumor necrosis factor α expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2205–11.
- ✓ Nutt RF, Caulfield MP, Levy JJ, Gibbons SW, Rosenblatt M, McKee RL. Removal of partial agonism from parathyroid hormone (PTH)-related protein-(7-34)NH₂ by substitution of PTH amino acids at positions 10 and 11. *Endocrinology* 1990;127:491-493.
- ✓ Ortego M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Díaz C, Hernández G, Egido J. Atorvastatin reduces NF- κ B activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis*. 1999;147:253–261.
- ✓ Ozeki S, Ohsuru A, Seto S, Takeshita S, Yano H, Nakayama T, Ito M, Yokota T, Nobuyoshi M, Segre G, et al. Evidence that implicates the parathyroid hormone-related peptide in vascular stenosis: increased gene expression in the intima of injured carotid arteries and human restenotic coronary lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:565–575.
- ✓ Pekkanen J, Linn S, Heiss G, Suchindran CM, Leon A, Rifkind BM, Tyroler HA. Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1990 Jun 14;322(24):1700-7

✓

- ✓ Penn MS, Sardel GM, Chilsom GM. Relative significance of endothelium and internal elastic lamina in regulating the entry of macromolecules into arteries in vivo. *Circ Res* 1993; 74:74-82.
- ✓ Pirola CJ, Wang H-M, Kamiar A, Wu S, Enomoto H. Angiotensin II regulates parathyroid hormona-related protein expresión in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J. Biol. Chem.*1993; 286: 1987-94
- ✓ Rámila D, Ardura J A, Esteban V, et al., Parathyroid hormonerelated protein promotes inflammation in the mouse obstructed kidney. *Kidney Int* (advance online publication, 9 January 2008; doi:10.1038/sj.ki.5002775).
- ✓ Ransgasway S, Penn MS, Saidel GM, Chilsom GM. Exogenous oxidized low density lipoprotein injuries and alters the barrier junction of endothelium in rats in vivo. *Cir Res* 1997; 80:37-44.
- ✓ Rian E, Jemtland R, Olstad OK, Endresen MJ, Grasser WA, Thide MA, Henriksen T, Bucht E, Gautvik KM. Parathyroid hormone-related protein is produced by cultured endothelial cells: a posible role in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198:740-747.
- ✓ Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Longterm effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) investigators. *Circulation* 1999;100:230-5.

- ✓ Ritchie ME. Nuclear factor- κ B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation* 1998;98:1707-13.
- ✓ Ross R. Atherosclerosis. An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
- ✓ Ross R, Fuster V. The pathogenesis of atherosclerosis in Fuster V, Ross R, Topol Ej (eds): atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia Lippincott- raven, pp441-460. 1996
- ✓ Ross G, Schluter KD. Cardiac-specific effects of parathyroid hormonelated peptide: modification by aging and hypertension. *Cardiovasc Res* 2005;66:334–44.
- ✓ Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, König S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res.* 2000 Jun 23;86(12):1266-72
- ✓ Ryoo SW, Kim DU, Won M, et al. Native LDL induces interleukin-8 expression via H2O2, p38 Kinase, and activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2004;62:185–93.
- ✓ Sanne van Wissen a, Mieke D. Trip a, Tineke J. Smilde b, Jacqueline de Graaf b, Anton
- ✓ Stalenhoef b, John J.P. Kastelein. Differential hs-CRP reduction in patients with familial
- ✓ hypercholesterolemia treated with aggressive or conventional statin therapy. *Atherosclerosis* 165 (2002) 361_/366

- ✓ Scheidegger KJ, James RW, Delafontaine P. Differential effects of lowdensity lipoproteins on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF- 1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000;275:26864–9.
- ✓ Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CJ, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1995;333:1301-1307.
- ✓ Schluter KD, Katzer C, Piper HM. A N-terminal PTHrP peptide fragment void of a PTH/PTHrP-receptor binding domain activates cardiac ET(A) receptors. *Br J Pharmacol* 2001; 132:427–432.
- ✓ Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, Mundt S, Hassing H, Patel S, Rosa R, Hermanowski-Vosatka, Wang PR, Zhang D, et al. Simvastatin has antiinflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21: 115–121.
- ✓ Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997;95:1062-1071.
- ✓ Stiko-Rahm A, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J, Hamsten A, Nilsson J. Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1099–109.

- ✓ Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, Libby P. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases- 1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation*. 1999;99:2503–2509.

- ✓ Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001;81:153–208.

- ✓ The 4S Investigators. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian simvastatin survival study (4S). *Lancet* 1994;344:1383–9.

- ✓ The 4S investigators. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-1389. 14.- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CJ, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1995;333:1301-1307.

- ✓ Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997;95:594-9.

- ✓ Tozer EC, Carew TE. Residence time low-density lipoprotein in the normal and atherosclerotic rabbit aorta. *Circulation* 1997;80:208-218.

- ✓ Vasavada RC, Garcia-Ocaña A, Massfelder T, Dann P, Stewart A. Parathyroid hormone-related protein in the pancreatic islet and the cardiovascular system. *Recent progress in hormone research* 1998;53: 305-340

- ✓ Van der Wal AC, Becker AE, Van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89:36–44.
- ✓ Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1992 ;141:1427-33.
- ✓ Vos J, deFeyter J, Simoons ML, Tijssen JGP, Deckers JW. Retardation and arrest of progression or regression of coronary artery disease: a review. *Prog Cardiovasc Dis* 1993; 35: 435-54
- ✓ Waxman S, Ishibashi F and Muller JE Approaches to Prevention of Coronary Events Detection and Treatment of Vulnerable Plaques and Vulnerable Patients: Novel. *Circulation* 2006;114;2390-2411
- ✓ Wysolmerski JJ, Stewart AF. The physiology of parathyroid hormone-related protein: an emerging role as a developmental factor. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:431-60
- ✓ Yang KH, Stewart AF. The PTH-related protein gene and protein products. *Principles of bone biology* Ed JP Bilezikian, L Raisz, G Rodan, pp.347-76. San Diego : Academic